

Aus der Klinik für Innere Medizin

-Pneumologie-

Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. Claus Franz Vogelmeier

des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

**Sekretomodulatorische Effekte des proinflammatorischen Zytokins
GM-CSF auf die Muzinsekretion an der isolierten Rattentrachea
nativer und NO₂-exponierter Tiere**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Humanmedizin

dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Inga Krohm aus Magdeburg

Marburg, 2019

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg
am: 18.03.2019

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

Dekan:	Herr Prof. Dr. H. Schäfer
Referent:	Herr Prof. Dr. U. Wagner
Korreferent:	Herr Prof. Dr. B. Schmeck

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	4
1 Einleitung	7
1.1 COPD	8
1.1.1 Definition	8
1.1.2 Epidemiologie und sozioökonomische Bedeutung	8
1.1.3 Ätiologie	10
1.1.4 Mediatoren bei COPD	11
1.1.4.1 Das Tachykinin Substanz P (SP)	13
1.1.4.2 Zytokine	13
1.1.4.2.1 GM-CSF	15
1.1.5 Pathogenese der chronischen Bronchitis	19
1.2 Physiologie der tracheobronchialen Sekretion	24
1.2.1 Mukus	24
1.2.2 Muzin	26
1.2.3 Neuronale Kontrolle der Mukussekretion der Atemwege	29
1.2.3.1 Cholinerge Regulation	29
1.2.3.2 Adrenerge Regulation	30
1.2.3.3 Sensible / Sensorische Regulation	32
1.2.3.4 Non-adrenerge, non-cholinerge (NANC) Regulation	32
1.3 Pathophysiologie der bronchialen Sekretion bei der COPD	33
1.4 Fragestellungen der vorliegenden Arbeit	37
2 Material und Methoden	38
2.1 Versuchsvorbereitung	38
2.1.1 Aufstellung der getesteten Substanzen und der verwendeten Chemikalien	38
2.1.2 Zusammensetzung der verwendeten Lösungen	39
2.1.3 Geräte und Zubehör	39
2.2 Methoden	40
2.2.1 Versuchstiere	40
2.2.1.1 Fischerratten (F344-Ratten)	40
2.2.1.2 Sprague-Dawley-Ratten (SD-Ratten)	40
2.2.2 Versuchsanlage zur NO ₂ -Exposition	41
2.2.3 Durchführung der modifizierten Ussing-Kammer-Methode	41
2.2.3.1 Die modifizierte Ussingkammer-Technik	41
2.2.3.2 Operation und Präparation der Trachea	42
2.2.3.3 Einsetzen der Ussing-Kammer in die Perfusionsapparatur	43
2.2.3.4 Prinzip des modifizierten Ussing-Kammer-Versuches	43
2.2.3.4.1 Aquilibrierung des Gewebes mit radioaktivem Schwefel	43
2.2.3.4.2 Abnahme der Sammlungen	44
2.2.3.4.3 Versuchsaufbau	44
2.2.3.4.4 Aufbereitung der Proben	46

2.2.3.4.5 Probenauswertung	47
2.3 Auswertungen der Daten und statistische Methoden	47
3 Ergebnisse	49
3.1 Hintergrund	49
3.2 Speziesvergleich der Basalsekretion und ACh-stimulierten Muzinsekretion nativ und nach Einfluss der inhalativen Noxe NO ₂	50
3.2.1 Basale und ACh-stimulierte Muzinsekretion der F344-Ratten-Trachea nativ und nach Kurz- und Langzeitexposition gegenüber 10 ppm NO ₂	51
3.2.2 Basale und ACh-stimulierte Muzinsekretion der SD-Ratten-Trachea nativ und nach Kurz- und Langzeitexposition gegenüber 10 ppm NO ₂	53
3.2.3 Basale Muzinsekretion nativ und nach Kurz- und Langzeitexposition gegenüber 10 ppm NO ₂ im Speziesvergleich	56
3.2.4 ACh-stimulierte Muzinsekretion nativ und nach Kurz- und Langzeitexposition gegenüber 10 ppm NO ₂ im Speziesvergleich	58
3.3 Untersuchung der Effekte der peptidergen Substanz P auf die Muzinsekretion ..	58
3.3.1 SP und sein Einfluss auf die tracheale Muzinsekretion bei der F344-Ratte	59
3.3.2 SP und sein Einfluss auf die tracheale Muzinsekretion bei der SD-Ratte	61
3.3.3 Untersuchung der Effekte von SP auf die Muzinsekretion: nativ und nach Kurz- und Langzeitexposition gegenüber 10 ppm NO ₂ im Speziesvergleich	63
3.4 Untersuchung des Einflusses des proinflammatorischen Zytokins GM-CSF auf die tracheale Muzinsekretion der NO ₂ -exponierten Ratten („Rattenmodell der COPD“) und im Vergleich zur nativen Rattentrachea	64
3.4.1 Untersuchung der Effekte von GM-CSF auf die Muzinsekretion der nativen F344-Ratten-Trachea	64
3.4.2 Untersuchung der Effekte von GM-CSF auf die tracheobronchiale Muzinsekretion nach Kurz- und Langzeitexposition der F344-Ratte gegenüber 10 ppm NO ₂	67
3.4.3 Hervorhebung der Effekte von GM-CSF auf die Muzinsekretion der langzeitexponierten F344-Ratten-Trachea	72
3.4.4 Untersuchung möglicher Interaktionen zwischen SP und GM-CSF bei der Stimulation der Muzinsekretion	73
3.5 Zusammenfassung	76
4 Diskussion.....	78
4.1 Methodik	80
4.1.1 Methoden zur Erfassung der Mukussekretion	80
4.1.2 Einsatz der modifizierten Ussing-Kammer-Technik unter Verwendung von ³⁵ S als radioaktiven Marker	84
4.1.3 Charakterisierung von Muzin-Glykoproteinen.....	84
4.1.4 Auswahl des Rattentrachea-Organ-Kulturmodells im Speziesvergleich	85
4.1.5 Einsatz von NO ₂ sowie dessen Einfluss auf die tracheobronchiale Muzinsekretion.....	87
4.1.6 Stickstoffdioxid-Konzentration und Expositionsdauer	88
4.1.7 Bestimmung der Basalsekretion (Äquilibrationszeit).....	92
4.1.8 Mehrfachstimulation der Muzinsekretion an einer Trachea	93

4.1.9	Aufbereitung der Proben durch die Dialyse	93
4.2	Ergebnisse der Sekretionsanalyse	94
4.2.1	Auswirkung von 10 ppm NO ₂ in unterschiedlicher Expositionsdauer auf das tracheobronchiale System bei F344-Ratten und SD-Ratten	94
4.2.1.1	Ergebnisse der Basalsekretion nach NO ₂ -Exposition im Speziesvergleich...	94
4.2.1.2	Auswirkung von ACh nach NO ₂ Exposition im Speziesvergleich	97
4.2.2	SP und seine Auswirkung auf die Muzinsekretion im Speziesvergleich.....	99
4.2.3	Einfluss des proinflammatorischen Zytokins GM-CSF auf die Muzinsekretion.....	101
4.2.3.1	Untersuchung der Wirkung von GM-CSF auf die Muzinsekretion der F344-Ratten-Trachea nativ sowie nach NO ₂ -Exposition.....	102
4.2.3.2	Untersuchung von Interaktionen zwischen dem Tachykinin SP und GM-CSF bei der Stimulation der Muzinsekretion.....	104
4.2.3.3	Diskussion von möglichen Interaktionen zwischen GM-CSF und dem adrenergen und cholinergen System	105
4.3	Antinflammatorische Therapieoptionen am Beispiel von GM-CSF	106
5	Zusammenfassung	111
	Literaturverzeichnis	117
	Tabellenverzeichnis	139
	Abbildungsverzeichnis	142
	Anhang	143

Abkürzungsverzeichnis

ACh	Acetylcholin
AgNOR	argyrophile Nucleolus - organisierende Regionen
AP-1	activator protein 1
BAL	bronchoalveoläre Lavage
BN-Ratten	Brown-Norway-Ratten
CGRP	calcitonin gene-related peptide
CMH	Chronische Mukushypersekretion
cpm	counts per minute
COPD	chronic obstructive pulmonary disease
Da	Dalton
EGF	epidermal growth factor
EGFR	epidermal growth factor receptor
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERK	Extracellular signal-regulated kinase
FGF	fibroblast growth factor
F344-Ratten	Fischerratten
FPLC	Fast Protein Liquid Chromatography
Gal	Galaktose
GalNAc	N-Acetylgalactosamin
G-CSF	granulocyte colony-stimulating factor
GlcNAc	N-Acetylglukosamin
GM-CSF	granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
GMR	GM-CSF Rezeptor
G6PD	Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase
GRO- α	growth-regulated-oncogene- α
GT	Glykosyltransferasen
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HPLC	High performance liquid chromatography
·OH	Hydroxyl-Radikal
IL-1ra	Interleukin-1-Rezeptorantagonist
IL-1 β	Interleukin 1 β
IL-3	Interleukin 3
IL-4	Interleukin 4
IL-5	Interleukin 5

IL-6	Interleukin 6
IL-8	Interleukin 8
IL-9	Interleukin 9
IL-12	Interleukin 12
IL-13	Interleukin 13
IL-17	Interleukin 17
IFN- γ	Interferon- γ
JAK	Januskinasen
LTB ₄	Leukotrien B ₄
LPS	Lipopolysaccharid
MAK	Maximale Arbeitsplatz-Konzentration
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MIP-1	macrophage inflammatory protein-1
MMPs	Matrixmetalloproteinasen
MM39 HTG	human tracheal gland cell line (Marc Merten)
MCP-1	monocyte chemoattractant protein-1
M-Rezeptor	muscarinerge Rezeptoren
MUC	Muzin
Na ₂ ³⁵ SO ₄	radioaktiv markiertes Natriumsulfat mit ³⁵ S
NANC	nicht-adrenerg nicht-cholinerg
NF κ B	nuclear factor kappa-B
NKA	Neurokinin A
NKB	Neurokinin B
NK-Rezeptor	Neurokinin-Rezeptor
NPY	Neuropeptid Y
NEP	Neutrale Endopeptidase
NE	Neutrophile Elastase
NO	Stickstoffmonoxid
NO ₂	nitrogen dioxide
O ₃	Ozon
PAF	platelet activating factor
PHI	peptide histidine isoleucine
PHM	peptide histidine methionine
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PGE ₂	Prostaglandin E ₂
ppm	parts per million

RARs	rapidly adapting receptors
ROS	reactive oxygen species
SD-Ratten	Sprague-Dawley-Ratten
SDS-PAGE	Sodium-Dodecyl-Sulfate-Polyacrylamide-Gel-Electrophoresis
SEM	standard error of the mean
^{35}S	radioaktiv markiertes Sulfat ($\text{Na}_2^{35}\text{SO}_4$)
SP	substance P
SOCS-1	suppressor of cytokine signaling 1
SO_2	sulfur dioxide
STAT	signal transducers and activators of transcription
$\text{O}_2^{\bullet-}$	Superoxid-Anion
PKB	Proteinkinase B
Tfs	Transkriptionsfaktoren der Forkhead-Familie
TH1-Zellen	T-Helferzellen vom Typ 1
TGF- α	transforming growth factor α
TGF- β	transforming growth factor β
TNF- α	tumor necrosis factor- α
TR	tandem repeat
VEGF	vascular endothelial growth factor
VIP	vasoactive intestinal polypeptide

1 Einleitung

Die vorliegende Arbeit soll einen Beitrag zur Aufklärung der noch weitgehend unbekannten, sehr komplexen, an der chronischen Bronchitis beteiligten pathophysiologischen Vorgänge liefern. Hierzu werden Versuchsmodelle angewendet, die Teilaspekte eines Gesamtmodellsystems der chronischen Bronchitis und COPD darstellen, wohlwissend, dass dieses Versuchssystem nicht die gesamte Komplexität reflektiert.

Die chronische Bronchitis stellt eine wesentliche Kondition der „chronic obstructive pulmonary disease“ (COPD) dar.

Stickstoffdioxid (NO_2) zählt beim Menschen als Umweltnoxide und als Bestandteil des Zigarettenrauches zu den ätiologischen Faktoren in der Genese der chronischen Bronchitis.

Bei der chronischen Bronchitis kommt es unter anderem unter dem Einfluss von proinflammatorischen Zytokinen zur chronischen Entzündung der Atemwegsschleimhaut mit charakteristischen Veränderungen des Epithels. Dies betrifft auch die Mucin-produzierenden epithelialen Komponenten wie die submukösen Drüsen. Veränderungen der Anzahl und Aktivität der sekretorischen Zellen mit Mucinüberproduktion und Hypersekretion führen zu quantitativen und qualitativen Veränderungen des Mukus.

Die Mukusschicht, welche das Atemwegsepithel überzieht, stellt ein Produkt komplexer Sekretionsvorgänge dar.

Humorale und neuronale Faktoren steuern die Mukussekretion der Atemwege. Neben den cholinergen, den adrenergen, den non-adrenergen non-cholinergen (NANC)-Mediatoren des autonomen Nervensystems sind eine Vielzahl anderer Mediatoren involviert. Die Bedeutung proinflammatorischer Zytokine hinsichtlich der Mukushypersekretion ist bisher noch unzureichend untersucht. Die vorliegende Arbeit möchte deshalb diese Teilaspekte besonders betrachten.

1.1 COPD

1.1.1 Definition

Die chronisch obstruktive Lungenerkrankung, im internationalen Sprachgebrauch chronic obstructive pulmonary disease (COPD), ist eine verbreitete Erkrankung, welche durch eine meist progrediente, persistierende Atemwegsobstruktion charakterisiert ist und mit einer erhöhten chronisch inflammatorischen Antwort der Atemwege gegenüber schädlichen Partikeln oder Gasen einhergeht. Exazerbationen und Komorbiditäten tragen zum Schweregrad der Erkrankung bei [168a].

Die chronische, für die COPD charakteristische, Atemwegsobstruktion wird einerseits durch Veränderungen der kleinen Atemwege (obstruktive Bronchiolitis) und andererseits durch eine parenchymatöse Destruktion (Emphysem) verursacht [67c]. Die pathologischen Mechanismen differieren dabei bei jedem Patienten in ihrer Ausprägung [67c], was zu klinisch verschiedenen Phänotypen führt [164a].

In der Definition der „Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease“ (GOLD) wird einer chronisch entzündlichen Antwort von Atemwegen und Lungen auf schädliche Partikel und Gase eine zentrale Rolle in der Pathogenese zugeschrieben [67c, 126]. Die chronische Inflammation verursacht strukturelle Veränderungen mit mukoziliärer Dysfunktion, eine chronisch progrediente irreversible Bronchialobstruktion und eine Destruktion des Lungenparenchyms, welche die bekannten klinischen Beschwerden wie Husten, Expektorat und Dyspnoe bei COPD-Patienten bestimmen.

Weiterhin ist die sich vorwiegend auf die klinische Symptomatik beziehende WHO Definition der chronischen Bronchitis zu erwähnen. Diese unscharfe Definition der chronischen Bronchitis beinhaltet produktiven Husten an mindestens drei aufeinander folgenden Monaten pro Jahr in zwei aufeinanderfolgenden Jahren.

1.1.2 Epidemiologie und sozioökonomische Bedeutung

Nach Schätzungen der WHO betrug die Prävalenz der COPD im Jahr 2016 weltweit 251 Millionen [184c].

Das BOLD-Projekt („Burden of obstructive lung disease“) stellt als eine standardisierte internationale Erhebung (zwölf Nationen) eine der umfangreichsten Untersuchungen zur Prävalenz der COPD dar [67a, 34]. Die Gesamtauswertung ergab eine Prävalenz 10,1% (COPD Stadium II oder höher nach spirometrischem Schweregrad der Obstruktion/ GOLD-Kriterien 2001) [34]. Ein Review von 2006 von Halbert *et al.*,

basierend auf Spirometrie-basierten Daten ergab eine gepoolte globale Prävalenz von 9,2%. Eine Metaanalyse, ebenfalls von Spirometrie-basierten Daten bei Personen ab dem 30. Lebensjahr, ergab eine globale Prävalenz von 10,7% für das Jahr 1990 und von 11,7% für das Jahr 2010 [2a]. Rycroft *et al.* beschreibt basierend auf einer Literaturrecherche aus dem Jahr 2012 unter Berücksichtigung entwickelter Länder eine Prävalenz Erwachsener von 0,2% in Japan bis zu 37% in den USA [144a].

Daten aus der EU zufolge liegt in der erwachsenen Bevölkerung bei 5-10% der über 40-jährigen eine mittelgradige oder schwere COPD vor. Werden auch milde Ausprägungen einberechnet, liegt die Prävalenz bei 15-20%. Für Männer über 70 Jahre wurde die Prävalenz von mittelgradiger und schwerer COPD bei ca. 20% und für Frauen bei 15% angegeben [98b].

Die Variabilität der berichteten epidemiologischen Daten zur COPD ist bedingt durch die Anwendung unterschiedlicher Methoden [144a], der Populationsauswahl [144a], der Altersverteilung [144a] und der Anwendung verschiedener Definitionen [144a], was einen validen Vergleich erschwert und auch bei Daten aus Europa [6b] berichtet wird

Die Ergebnisse der BOLD-Studie für Deutschland wurden in der Region in und um Hannover erhoben, wobei eine repräsentative Stichprobe von 683 Probanden im Alter ≥ 40 Jahren erstellt wurde. Mit Hilfe standardisierter Fragebögen wurden relevante Daten erhoben, alle Teilnehmer führten eine Spirometrie vor und nach Inhalation des Bronchodilatators Salbutamol durch. Die Prävalenz der COPD Schweregrad GOLD $\geq I$ lag für Deutschland bei 13,2%, wovon über die Hälfte der Personen an einer COPD Schweregrad GOLD I (7,4%) litten [67a]. Die Zunahme der Prävalenz wies dabei eine Korrelation zum Lebensalter und zum Zigarettenkonsum auf. Bezogen auf die Bundesrepublik Deutschland würde das etwa einer Personenzahl von 5,9 Millionen entsprechen. Der Anteil aktiver Raucher in der gesamten Stichprobe lag bei 20,6%, bei Männern und Frauen etwa gleich. Bei der Betrachtung des Anteils aktiver und ehemaliger Raucher beider Geschlechter fiel auf, dass die Prävalenz der aktiven und ehemaligen Raucherinnen in den jüngeren Altersgruppen deutlich über der in den älteren lag [67a]. Hierbei wird das veränderte Rauchverhalten in der weiblichen Bevölkerung deutlich. Nicht nur der erhöhte Tabakkonsum bei Jugendlichen, insbesondere der bei Frauen, auch die steigende Lebenserwartung und die bessere Abgrenzung zu anderen Erkrankungen lässt für die kommenden Jahre eine weitere Zunahme der Erkrankungshäufigkeit erwarten. Neuere epidemiologische Daten der GEDA Studie 2014/2015-EHIS beschreiben bei Erwachsenen ab 18 Jahren für Deutschland eine 12-Monats-Prävalenz der bekannten COPD von insgesamt 5,8%, hierbei 5,8% bei Frauen und 5,7% bei Männern [154b]. Eine spezifische Verteilung der

Häufigkeit der COPD beobachtet man bei Patienten mit niedrigem sozioökonomischen Status [67b, 129b]. Dies ist zurückzuführen auf Unterschiede im Gesundheitsbewußtsein, zudem spielen soziopolitische Faktoren und soziale sowie strukturelle Umgebungsbedingungen eine Rolle [129b].

Hinsichtlich Krankenhauseinweisungen ergab sich für die COPD für 31 europäische Länder eine durchschnittliche altersjustierte Einweisungsrate von 200 pro 100.000 Einwohnern im Jahr [60b].

Die Mortalität der COPD zeigt in den letzten drei bis vier Jahrzehnten einen Anstieg [144a]. Nach jüngeren Daten der WHO aus dem Jahr 2018 verstarben im Jahr 2016 drei Millionen Menschen an den Folgen einer COPD weltweit. Bezugnehmend auf Schätzungen der WHO war die COPD im Jahr 2000 global die vierthäufigste und im Jahr 2016 die dritthäufigste Todesursache [184a, 184b]. In Ländern mit hohem Einkommen wurde die COPD im Jahr 2016 als fünfthäufigster Grund für das Versterben angegeben [184a, 184b].

Hinsichtlich der Gesamtkrankheitsbelastung (DALY-„Disability-Adjusted Life Year“) gewinnt die COPD eine zunehmende Rolle [98a], 2013 nahm die COPD weltweit die 5. Position bezüglich der Zahl von DALYs ein [117a].

Die jährlichen Gesamtkosten der COPD in Deutschland werden auf 5,47 Mrd. Euro geschätzt [168]. Durch die COPD fallen in Deutschland zufolge einer prospektiven Krankheitskostenstudie an 785 COPD-Patienten hochgerechnet direkte Kosten von 4,50 Mrd. Euro (41,4% Arzneimittelkosten, 31,6% Hospitalisierung, 20,6% ärztliche Leistungen) [168] und indirekte Kosten von 3,94 Mrd. Euro (45,8% Arbeitsunfähigkeit, 21,7% Pflegekosten) an. Aus volkswirtschaftlicher Sicht wurden die durchschnittlichen jährlichen Kosten in Deutschland pro COPD-Patient auf 3027 Euro (26% Krankenhausaufenthalte, 23% Medikamente, 17% Frührente, 1,5% Rehabilitation) geschätzt [168]. Daten aus der deutschen multizentrischen Kohortenstudie (COSYCONET) aus dem Jahr 2012 ergaben je nach Stadium GOLD I-IV direkte Krankheitskosten zwischen 2.595 und 8.924 Euro, indirekte Kosten von 8.621 bis 27.658 Euro pro Patient [169a].

Im Jahr 2011 wurden in der EU die direkten Krankheitskosten jährlich auf 23,3 Milliarden € und die indirekten Krankheitskosten auf 25,1 Milliarden € geschätzt [60c].

1.1.3 Ätiologie

Für die COPD sind verschiedene auslösende Faktoren bekannt, welche einzeln oder durch ihr Zusammenwirken das Auftreten einer COPD bedingen. Neben endogenen

Risikofaktoren wie Antikörpermangelsyndrome, α_1 -Proteaseinhibitormangel, primäre ziliäre Dyskinesie und genetischen Faktoren sind vor allem die exogenen Ursachen von Bedeutung.

Tabakrauch stellt einen Risikofaktor für eine chronische Mukus-Hypersekretion dar [62b], welche wiederum ein unabhängiger Risikofaktor für die Entwicklung einer COPD ist [62a]. Mit einem relativen Risiko von 13 ist Tabakrauch der wesentliche Risikofaktor für die Entstehung einer COPD [6]. Eine Metaanalyse von Studien aus den Jahren 1990 bis 2004, ergab, dass sich unter Rauchern oder Exrauchern eine weitaus höhere Prävalenz findet, als unter Nichtrauchern [70a]. Mehr als 900 Todesfälle jährlich sind in Deutschland auf eine durch Passivrauchen verursachte COPD zurückzuführen [6]. Trotzdem, dass ungefähr 90% aller COPD Patienten Raucher sind [134, 6, 188], entwickeln nur 10-20% der Raucher eine COPD [27, 134, 102]. Dies spricht für eine Reihe von anderen möglichen Ursachen [102]. Es ist wahrscheinlich, dass andere Faktoren einen ähnlichen inflammatorischen Prozess einleiten. Die Beteiligung genetischer Faktoren [11] könnte eine mögliche Erklärung für dieses Phänomen sein.

Weitere Risikofaktoren sind unter anderem Innenraumluftverschmutzungen und Außenluftverschmutzungen [126], wobei Luftverschmutzung sowohl akute, als auch chronische Gesundheitsschäden verursachen kann [125b, 147c].

NO₂ ist ein Luftschadstoff von Landwirtschaft, Industrie, Energieerzeugung und Verkehr [52a] im Freien und von Zigarettenrauch in Innenräumen [116]. Neben Feinstaub (PM_{2.5}, PM₁₀), O₃, SO₂ und weiteren, verursacht vor allem NO₂ als atmosphärischer Schadstoff und einer der Hauptoxidantien in der städtischen Umgebung [147b] gesundheitsschädliche Effekte der Atemwege [60a]. Dazu zählen bronchiale Hyperreagibilität [91a], oxidativer Stress [6a], pulmonale und systemische Inflammation [83a], Begünstigung pulmonaler Infektionen [87a] sowie Reduktion der Zilienfunktionalität [77a]. Stickstoffoxide entstehen bei Verbrennungsprozessen [52a]. Als ein Hauptschadstoff des Zigarettenrauchs wird NO₂ eine Relevanz bei der Entwicklung einer COPD [147b] zugeschrieben.

Mehrere Studien zeigen, dass die Exposition von nasalen und bronchialen Epithelzellen gegenüber NO₂ eine Synthese und Freisetzung proinflammatorischer Mediatoren wie Zytokinen bewirkt [114].

1.1.4 Mediatoren bei COPD

Obwohl zunehmend inflammatorische Zellen bei der COPD erkannt und dokumentiert werden [13], ist die Beziehung zwischen diesen Zelltypen und die Sequenz ihres

Erscheinens und deren Persistenz größtenteils unklar. Die Koordination zwischen den verschiedenen Zelltypen, welche an einer Entzündungsreaktion beteiligt sind, setzt ein Kommunikationssystem voraus, das aus einer Vielzahl von verschiedenen Mediatoren besteht.

Zu den inflammatorischen Zellen der COPD gehören die neutrophilen Granulozyten, Makrophagen, T-Lymphozyten, eosinophilen Granulozyten, dendritische Zellen sowie Epithelzellen [14].

Tabelle 1.1 Mediatoren der COPD

Lipidmediatoren	Prostaglandine, Leukotriene, plättchenaktivierender Faktor (PAF)
Reaktive Sauerstoffspezies	u.a.: Superoxid-Anion ($O_2^{\cdot-}$), [Wasserstoffperoxid (H_2O_2)] Hydroxyl-Radikal ($\cdot OH$)
-Antioxidantien	Antioxidative Enzyme: z. B. Katalase, Superoxiddismutase (SOD) andere: Glutation, Ascorbat
Stickoxide/ Reaktive Stickstoffspezies	Stickstoffmonoxid ($NO\cdot$), (Peroxynitrit)
Peptidmediatoren	Endotheline, Bradykinine, Tachykinine, Komplement-Fragmente
CXC-, CC-, C-, CX ₃ C-Chemokine	u. a. Interleukin 8 (IL-8), monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), macrophage inflammatory protein-1 (MIP-1), growth-regulated-oncogene- α (GRO- α)
Zytokine	Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF- α), Interleukin 1 β (IL-1 β), Interleukin 6 (IL-6), Interleukin 9 (IL-9), Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor (GM-CSF), IL-10, Interleukin 12 (IL-12), Interleukin 13 (IL-13), Interleukin 17 (IL-17), Interferon- γ (IFN- γ)
Wachstumsfaktoren	transforming growth factor (TGF), epidermal growth factor (EGF), vascular endothelial growth factor (VEGF), fibroblast growth factor (FGF)
Proteasen	Serinproteasen (u. a. Neutrophile Elastase (NE)), Cysteinproteasen, Matrixmetalloproteinasen (MMPs), Antiproteasen

1.1.4.1 Das Tachykinin Substanz P (SP)

Tachykinine wie Substanz P (SP) kommen in den Atemwegen in unmyelinisierten C-Fasern vor [163, 155] und gehören zum „sensorisch efferenten“ NANC-System [133].

SP wird von den sensorischen Nervenendigungen freigesetzt und nimmt neben den anderen Tachykininen bei dem Phänomen der „neurogenen Entzündung“ eine maßgebliche Rolle ein [174]. SP-immunreaktive Nerven finden sich zum Beispiel unterhalb und innerhalb des Atemwegsepithels, in der Nähe der Arteriolen der Mukosa, der submukösen Drüsen [133] und Ausführungsgänge [174], innerhalb der glatten Bronchialmuskulatur und in der Nähe lokaler parasymphathischer Ganglien [163]. SP zeigt einen Einfluss auf die glatte Muskulatur (Konstriktion), fibrotische Prozesse [12], die Blutgefäße (Vasodilatation), die mikrovaskuläre Permeabilität und auf die bronchialen Drüsen (Hypersekretion) [163]. In unserer Arbeitsgruppe wurden folgende Tachykinine hinsichtlich ihrer Stimulation der Muzinsekretion untersucht: SP > NKA (Neurokinin A) > NKB (Neurokinin B) [174]. Passend hierzu findet man in der Literatur, dass aus der Reihe der Tachykinine SP am potentesten die Mukussekretion von submukösen Drüsen in humanen Atemwegen *in vitro* und *in vivo* stimuliert [163]. Zusätzlich ist SP ein potenter Stimulator der Becherzellsekretion [163]. Bezüglich der sekretorischen Stimulation wird die Bedeutung des NK₁-Rezeptors erwähnt [12, 174]. Tachykinine erhöhen zudem die cholinerge Neurotransmission [12].

Eine erhöhte SP-Konzentration konnte im induzierten Sputum von Patienten mit einer chronischen Bronchitis nachgewiesen werden [14]. Exogene Substanzen wie unter anderem Zigarettenrauch und andere inhalative Irritantien sowie endogene Substanzen können als mögliche Stimuli zu einer Ausschüttung von Tachykininen an sensorischen Nervenendigungen führen [163]. SP spielt somit eine Rolle bei inflammatorischen Prozessen mit Einfluss auf Zielzellen wie Neutrophile, Eosinophile, T-Lymphozyten, dendritische Zellen, Mastzellen, Monozyten, Makrophagen und bronchiale Epithelzellen [163] und andere Entzündungsmediatoren. So fördert SP unter anderem die neutrophile und eosinophile [12] Chemotaxis und kann inflammatorische Zellen wie zum Beispiel Makrophagen zur Ausschüttung von Zytokinen wie Interleukin 6 (IL-6) [12] veranlassen [163].

1.1.4.2 Zytokine

Zytokine sind extrazelluläre Signalproteine und regulieren als multifunktionelle Mediatoren das Wachstum sowie die Differenzierung von Zellen. Dabei nehmen sie

Einfluss auf Zellaktivierung, Entzündungsprozesse, Immunität, Gewebsreparatur und Fibrose [86].

Zunehmendes Interesse gilt den proinflammatorischen Zytokinen in Bezug auf die Pathogenese nicht allergischer Erkrankungen wie der chronischen Bronchitis oder der COPD [114].

Als Mediatoren der Inflammation [128] werden Zytokine in der Lunge unter anderem als Antwort auf mikrobielle Pathogene oder inhalative Reizstoffe [114, 75] durch verschiedene Zelltypen wie zum Beispiel bronchiale Epithelzellen [75], Neutrophile, Makrophagen, Monozyten und Endothelzellen [128] synthetisiert und sezerniert. Obwohl mehrere Zellen zur Zytokinproduktion fähig sind, ist der Trigger, welcher eine spezifische Produktion induziert, unterschiedlich zwischen den Zellen [86]. Zytokine können auf endokrinem, parakrinem oder autokrinem Wege stimuliert werden. Die Funktionen der Zytokine sind redundant. Neben Zell-Zell-Kommunikation sind sie, abhängig von Zellen, Ziel und Phase der Immunantwort, fähig, mehr als nur eine Zellfunktion zu modulieren [86]. Durch Bindung an spezifische hochaffine Oberflächenrezeptoren [86, 40] an ihren Zielzellen mit anschließender Signalübertragung beeinflussen Zytokine die Zellreaktionen. Zytokine können so unter anderem über die Aktivierung von spezifischen Signaltransduktionswegen die Muzingenexpression erhöhen [2].

Viele Zytokine haben proinflammatorisches und antiinflammatorisches Potential [29]. Dabei sind die Zytokine nicht nur an Entzündungsreaktionen mit daraus resultierender Gewebedestruktion beteiligt, sondern auch an den anschließenden Reparaturvorgängen und spielen so eine Rolle in der Aufrechterhaltung physiologischer Abläufe. Eine Dysbalance zwischen pro- und antiinflammatorischen Zytokinen ist wahrscheinlich eine Ursache vieler chronisch-entzündlicher Erkrankungen, wie zum Beispiel der COPD.

Die Klassifikation der Zytokine wird wie folgt vorgenommen: Proinflammatorische und chemotaktische Zytokine, T-Zell-abgeleitete Zytokine, anti-inflammatorische Zytokine und Wachstumsfaktoren [40].

Proinflammatorische Zytokine, welchen bei dem Entzündungsprozess der COPD eine Bedeutung beigemessen werden, sind der Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF- α), Interleukin 1 β (IL-1 β), IL-6 und der Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierende Faktor (GM-CSF) [14].

Im Folgenden soll auf die Rolle von GM-CSF in der Entzündungsreaktion und auf dessen proinflammatorische Bedeutung näher eingegangen werden.

1.1.4.2.1 GM-CSF

GM-CSF ist ein 22-25 kD Glykoprotein [153] und wurde ursprünglich als ein Wachstumsfaktor für weiße Blutkörperchen beschrieben. Dieses Zytokin induziert die Proliferation und Reifung verschiedener hämatopoetischer Zelllinien des Knochenmarks [110]. Zusätzlich sorgt GM-CSF für das sogenannte Priming, wodurch verschiedene Zellen sensitiver für einen sekundären Stimulus, wie zum Beispiel auf chemotaktische Reize, gemacht werden [178]. GM-CSF scheint darüber hinaus eine antitumoröse Immunität zu induzieren [56] und ist in die Pathogenese der rheumatoiden Arthritis [22a, 34a, 106] und weiterer, zumeist autoimmun vermittelter Erkrankungen involviert [24a]. Einen therapeutische Ansatz stellen GM-CSF-Autoantikörper bei der rheumatoiden Arthritis dar [22a, 34a]. Weitere therapeutische Angriffspunkte stellen die durch GM-CSF induzierte IL-1 Produktion aktivierter neutrophiler Granulozyten (Multiple Sklerose), die durch GM-CSF vermittelte Autoantikörperproduktion (Epidermolysis bullosa acquisita) und die protektiven Effekte von GM-CSF bei der Verhinderung der neutrophilen Apoptose (Juveniler systemischer Lupus erythematodes) dar [24a].

Die physiologische GM-CSF-Konzentration im Serum reicht von 20 bis 100 pg/ml [44a].

Während GM-CSF als proinflammatorisch aktiver Mediator Einfluss auf die Lungenhomöostase hat [184], wird seine Relevanz bei pulmonalen inflammatorischen Erkrankungen zunehmend erörtert [175].

GM-CSF wird von einer Vielzahl aktivierter Zelltypen gebildet. Zum Beispiel sezernieren Epithelzellen [125, 123, 161], Makrophagen [125, 123, 161, 153], zum Teil T-Zellen [153, 123, 161], Eosinophile [60], Endothelzellen [161, 153], interstitielle Zellen [125], Keratinozyten [38, 153], vaskuläre Zellen [38], glatte Muskelzellen der Atemwege [38], Osteoblasten [153] und Fibroblasten [38, 153] GM-CSF.

GM-CSF-Rezeptor:

Strukturell ist GM-CSF ein „4-Helix-Bündel“-Protein [167]. Der Rezeptor für GM-CSF ist ein Mitglied der Hämatopoetin-Rezeptor-Superfamilie. Viele Rezeptoren fungieren als Heterodimere mit einer Untereinheit, deren primäre Rolle die Bindung der Zytokine ist, während die andere Untereinheit sekundär bindet [7]. Der GM-CSF Rezeptor (GMR) setzt sich aus den zwei Untereinheiten [4], einer Zytokin-spezifischen α -Kette (GMR α) [106], die allein GM-CSF nur mit geringer Affinität [4] bindet, und einer β -Kette (β c) [106, 4], zusammen.

Einerseits ermöglicht die β -Kette, ohne Kontakt zu GM-CSF zu haben, die Bildung eines hochaffinen GM-CSF-Rezeptors [4], andererseits ist die β -Kette für die Signaltransduktion notwendig [106, 167].

Die Rezeptoren für Interleukin 3 (IL-3) beziehungsweise Interleukin 5 (IL-5) besitzen dieselbe β -Kette [106, 167]. Aus diesem Grund wird diese als β_c (c=common) bezeichnet.

Der Einfluss auf Priming, Wachstum und Entzündungen durch GM-CSF geschieht über intrazelluläre Signalwege und erfolgt über unterschiedliche Pfade: den Januskinasen / „signal transducers and activators of transcription“-Pfad (JAK / STAT-Pfad), über die „mitogen-activated protein kinase“ (MAPK)-Kaskade und über die Aktivierung der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) [167]. Van de Laar *et al.* berichten, dass GM-CSF die Transkription über folgende Signalwege einleitet: PI3K-Akt, „extracellulär signal-regulated kinase“ (ERK $\frac{1}{2}$), JAK2/STAT5 und NF- κ B [162a].

Die Ketten verfügen über keinerlei eigene Signalaktivität. Verwandte Kinasen, wie die der Mitglieder der Januskinasen (JAK)-Familie oder src Kinasen wie Fes oder Lyn kommen zum Einsatz [7].

Mittler wie JAK2 werden zum Beispiel zur Dimerisierung der Transkriptionsfaktoren STAT3 und STAT5 benötigt [167]. So kann die Transkription, das heißt die Bildung inflammationsbedeutsamer Substanzen, reguliert und beeinflusst werden [178].

Via der src-Kinase Lyn wird eine Aktivierung der PI3K ermöglicht und dies wiederum führt zur Aktivierung der AKT/ Proteinkinase B (PKB) [167]. AKT reguliert das Überleben von Zellen, indem es deren Apoptose größtenteils mit Hilfe von Transkriptionsfaktoren der Forkhead-Familie (Tfs) inhibiert [167].

Die Signaltransduktion über den MAPK-Pfad geschieht über die Ras/Raf-abhängige Aktivierung von MAP-Kinasen. Dieser Signaltransduktionsweg ist ein wichtiger Vermittler für die von GM-CSF induzierten biologischen Ereignisse, wie zum Beispiel von proinflammatorischen Aktivitäten.

Aktivierte Kinasen sorgen wiederum für die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren.

Verschiedene proinflammatorische Transkriptionsfaktoren wie „activator protein 1“ (AP-1) und „nuclear factor kappa-B“ (NF κ B) spielen eine Rolle bei der Genregulation.

Die terminale Differenzierung von Alveolarmakrophagen durch GM-CSF ist zum Beispiel vom Transkriptionsfaktor PU.1 abhängig [167].

GM-CSF unterstützt das Zellüberleben durch PI3K [167] und JAK/STAT5-Bcl-2 [39a] und beeinflusst die Zellproliferation und inflammatorische Antwort [125a] hauptsächlich über ERK(1/2)- und NF- κ B-Signalübertragung [43a, 58a].

Über einen negativen Regulationsmechanismus, zum Beispiel über die regulatorischen „suppressor of cytokine signaling 1“-Proteine (SOCS-1), können die über den GM-CSF-Rezeptor vermittelten Aktivierungssignale gegenkontrolliert werden [167].

GM-CSF und Lungeninflammation:

Unter physiologischen Bedingungen sezerniert das Lungenepithel GM-CSF in geringen Mengen, um über die Aktivierung des Transkriptionsfaktors PU.1 die terminale Differenzierung von Alveolarmakrophagen zu induzieren [151].

Einige Schadstoffe wie zum Beispiel Nikotin [14, 91] und NO₂ [114, 53] induzieren eine über das physiologische Maß hinaus gehende GM-CSF-Freisetzung. GM-CSF als ein hämatopoetischer Wachstumsfaktor ist vermutlich bei der von Rauchern beschleunigten Hämatopoese involviert [167]. Rauchen hat einen direkten stimulierenden Effekt auf die Granulozytenproduktion, welcher wahrscheinlich durch den Granulozyten-Kolonie-stimulierenden Faktor (G-CSF) und GM-CSF von Lungenmakrophagen vermittelt wird [14].

Zudem konnte gezeigt werden, dass GM-CSF als Antwort auf die transnasale Instillation von Lipopolysaccharid (LPS) in der Bronchoalveolären Lavage (BAL) erhöht ist [167].

Inflammatorische Stimuli haben somit eine erhöhte GM-CSF-Sekretion, vor allem durch Epithelzellen und residente Makrophagen, zur Folge [167]. Nach Exposition gegenüber inhalativen Noxen ist GM-CSF eines der Schlüsselzytokine, welches die bronchiale Inflammation und die Zunahme einer bronchialen Überempfindlichkeit verursacht [123].

GM-CSF ist chemotaktisch [125] für Alveolarmakrophagen und fungiert als ein autokriner sowie parakriner Wachstumsfaktor und aktivierender Faktor für Makrophagen der Lunge. Es kann die antimikrobielle Aktivität von Makrophagen gegen Pathogene fördern [125]. Die Wirkung von GM-CSF auf die Alveolarmakrophagen spielt unter anderem eine wichtige Rolle bei der Regulation des Surfactant [125].

GM-CSF ist zusätzlich ein chemotaktischer Faktor für Neutrophile, Eosinophile [114] und stimuliert neben Makrophagen [71a] die Proliferation und Differenzierung von neutrophilen und eosinophilen Granulozyten [153]. Als Antwort auf GM-CSF zeigen Makrophagen und Granulozyten neben einem Anstieg ihrer Anzahl eine erhöhte Effektorfunktion [106]. Ferner verhindert GM-CSF den programmierten Zelltod von Neutrophilen [161, 94], Eosinophilen [161, 94, 60] sowie Monozyten [94] / Makrophagen [186] und trägt auf diese Weise zu deren verlängertem Überleben [106] bei.

GM-CSF regt Monozyten / Makrophagen und Neutrophile als Antwort auf Endotoxin oder andere inflammatorische Stimuli unter anderem zur erhöhten Produktion und Abgabe von Zytokinen sowie Sauerstoffradikalen an [184]. Aktivierte Neutrophile synthetisieren so unter anderem proinflammatorische Zytokine wie $\text{TNF-}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$ und Interleukin 8 (IL-8) [189].

Es ist denkbar, dass GM-CSF die Anzahl von CD8-positiven T-Zellen indirekt über pulmonale dendritische Zellen reguliert [167].

Eosinophile, welche vor allem eine Bedeutung beim Asthma einnehmen, zeigen eine Zunahme ihrer Anzahl während der Exacerbation einer COPD [167]. GM-CSF beeinflusst die Reifung der Eosinophilen sowie die Zunahme der eosinophilen Funktionen wie Chemotaxis, Degranulation und Zytokin-Produktion [123].

Primärkulturen von humanen bronchialen Epithelzellen zeigten eine physiologische basale GM-CSF-Freisetzung, welche sich durch $\text{IL-1}\beta$ steigern ließ [91]. Autoren anderer Studien berichten ebenfalls von einer Stimulation von GM-CSF durch das proinflammatorische Zytokin $\text{IL-1}\beta$ [23, 45, 48]. Interleukin 4 (IL-4) oder Interleukin 13 (IL-13) inhibieren dosisabhängig die $\text{IL-1}\beta$ -induzierte GM-CSF Freisetzung [23].

$\text{TNF-}\alpha$ [45, 128] kann die GM-CSF-Sekretion durch verschiedene Zelltypen wie zum Beispiel Epithelzellen [123], T-Zellen [123] und Eosinophile [60] induzieren.

Einige Chemokine [167] induzieren ebenfalls die autokrine Produktion von GM-CSF durch Eosinophile.

Einige Autoren berichten von einer GM-CSF-vermittelten [71] Sekretion inflammatorischer Zytokine wie $\text{IL-1}\beta$ und $\text{TNF-}\alpha$ durch Makrophagen [123].

GM-CSF stimuliert die Interleukin 12 (IL-12) Produktion mit einem wiederum fördernden Einfluss vor allem auf T-Helferzellen vom Typ 1 (TH1 -Zellen) [178].

GM-CSF hat einen Einfluss auf die glatte Muskulatur der Atemwege [38] und nimmt eine Bedeutung bei strukturellen Veränderungsprozessen der kleinen Atemwege ein [167].

Einige Studien berichten neben der proinflammatorischen Wirkung auch von einer antiinflammatorischen Wirkung [71].

So erhöht GM-CSF zum Beispiel die Produktion des IL-1 -Rezeptorantagonisten (IL-1ra) durch Makrophagen [113].

IL-10 wirkt antiinflammatorisch, indem es die Produktion proinflammatorischer Zytokine, wie zum Beispiel GM-CSF, hemmt.

Vasoaktives intestinales Peptid (VIP) [117], Serotonin [91], SP [91] und das „calcitonin gene-related peptide“ (CGRP) [91] zeigen keine signifikanten Effekte auf eine GM-CSF-Freisetzung.

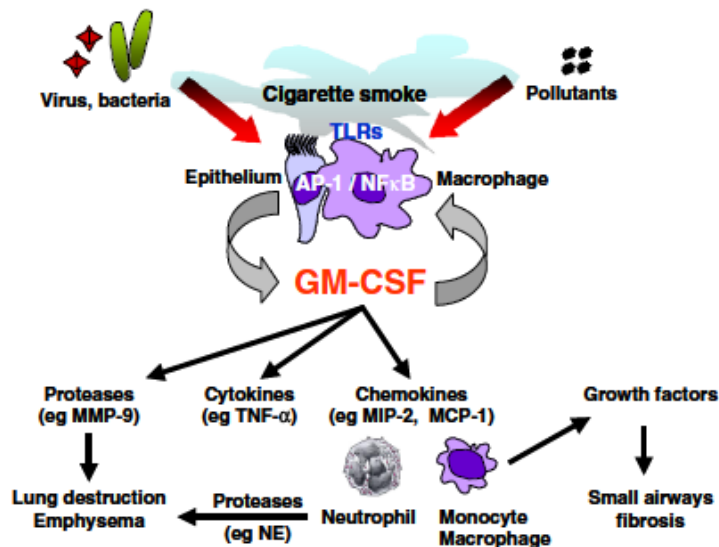


Abbildung 1.1 Mögliche relevante Schlüsselaktionen von GM-CSF bei der COPD [167]

GM-CSF nimmt unter anderem durch seinen Einfluss auf Eosinophile eine bedeutende Rolle in der Pathogenese allergischer Atemwegserkrankungen [123] wie dem Asthma bronchiale ein.

Zunehmende Mengen von GM-CSF wurden auch in der BAL von Patienten mit chronischen Lungenerkrankungen nichtallergischer Natur mit Assoziation zur Eosinophilie nachgewiesen [187].

Die Rolle von GM-CSF in der Pathogenese der COPD bleibt im Detail noch zu charakterisieren. GM-CSF ist einerseits in der BAL bei stabiler COPD [9], vor allem jedoch während einer Exazerbation vermehrt nachweisbar [9, 159]. Es wurde gezeigt, dass die Sekretion von GM-CSF durch Alveolarmakrophagen bei COPD-Patienten und bei Rauchern annähernd gleich ist [48]. Ziora *et al.* [190] berichten beim Vergleich der Stadien der COPD von einem höheren GM-CSF-Level bei den Kontrollen. Betz *et al.* [24] wiederum konnte GM-CSF nicht im Sputum von COPD-Patienten nachweisen.

1.1.5 Pathogenese der chronischen Bronchitis

Die zwei Hauptcharakteristika der chronischen Bronchitis sind eine vermehrte Mukusproduktion und eine chronische inflammatorische Zellinfiltration der Bronchialwand. Chronische Mukushypersekretion (CMH) ist verbreitet unter Rauchern [3a]. Bei jenen mit COPD ist die CMH mit wiederholten Exazerbationen [90a], einer progressiven Abnahme der Lungenfunktion [164b], häufigeren Hospitalisationen [164b]

sowie einer höheren Mortalität assoziiert [3a], wohingegen bei Rauchern ohne COPD eine CMH einen Risikofaktor für die Entwicklung einer COPD darstellt [69a]. Klinisch relevante Mukussekretion betrifft die großen Atemwege. Die Atemwegsobstruktion, induziert durch strukturelle Umbauprozesse sowie Mukus, zeigt sich im Bereich der Bronchiolen und der terminalen Atemwege.

Die übermäßige Mukusproduktion mit Expektorat korreliert mit einer Drüsenhypertrophie (Reid Index) im Bereich der großen Atemwege [188]. Veränderungen der mukusproduzierenden Zellen, welche nicht COPD-spezifisch sind, beinhalten eine Zunahme der Zellanzahl via Proliferation (Hyperplasie) und eine erhöhte Mukussynthese und Sekretion (Hypertrophie und Metaplasie). Die Zunahme der Sekretmenge ist auf die Hypertrophie von submukösen Drüsen, eine Becherzellhyperplasie und eine Metaplasie zurückzuführen, welche sich zu den peripheren Atemwegen hin ausweitet und eine Komponente der Atemwegsobstruktion darstellt [143].

Inflammatorische Zellen

Die akute bronchopulmonale Inflamationsantwort gegenüber spezifischen und unspezifischen Triggern wie der Kontakt zu Keimen, Stäuben und inhalativen Noxen führt typischerweise zu einer lokalen Zunahme der vaskulären Permeabilität mit Infiltration von inflammatorischen Zellen und einer möglichen Zunahme der Atemwegssekretion. Wurde das schädliche Agens erfolgreich eliminiert, sollte die Inflammation mit Rückkehr zur normalen Homöostase überwunden sein [84].

Durch zunehmende unphysiologische Belastungen der Atemwege durch eine kontinuierliche Exposition gegenüber inhalativen Schadstoffen wie Tabak, Ozon (O_3), Schwefeldioxid (SO_2) und NO_2 [100] kommt es zu einer komplexen Kaskade mit der Rekrutierung inflammatorischer Zellen. Die bei einer COPD vorherrschende ausgeprägte Entzündung, die im Bereich der großen und kleinen Atemwege vorliegt, ist schon in frühen Stufen der Erkrankung nachweisbar und nimmt mit dem Schweregrad zu.

Zu den dominierenden Zelltypen bei der COPD zählen Makrophagen [11, 146, 90], die neutrophilen Granulozyten [11, 146, 90] und die CD8-positiven T-Lymphozyten [11, 145, 146, 90]. Mit einem geringen Anteil konnten auch CD4-positive T-Lymphozyten nachgewiesen werden [90]. Im Rahmen von Exazerbationen [188] kann es auch zu einer Erhöhung eosinophiler Granulozyten kommen.

Neben den Immunzellen sind auch Zellen des Lungengewebes am Inflammationsprozess beteiligt. Dazu gehören zum Beispiel die Mesenchym- und Epithelzellen.

Bronchialepithelien sind sowohl Ziel als auch Faktor der Entzündungskaskade. Mediatoren können von den Epithelzellen der Atemwege als Reaktion auf schädliche Gase wie NO₂ [114] oder bakterielle Produkte [96] sezerniert werden. Epithelzellen stellen aber auch ein Ziel für endogene Stimuli wie Mediatoren zum Beispiel Zytokine [1] von infiltrierten inflammatorischen Zellen dar. Aufgaben des Bronchialepithels im Sinne eines komplexen Funktionsapparates beinhalten die Abwehr der Atemwege durch antimikrobielle Aktivität. Letztere erfolgt durch eine Sekretion von Antioxidantien sowie Antiproteasen und durch Mukusproduktion [14]. Weiterhin reguliert das Bronchialepithel andere Zellen durch die Expression von Adhäsionsmolekülen [114] und durch Synthetisierung und Freisetzung einer Vielfalt von Mediatoren wie zum Beispiel von proinflammatorischen Zytokinen wie IL-6 [46], IL-8 [14, 46], TNF- α [14], IL-1 β [14] und GM-CSF [14, 46] sowie „transforming growth factor β “ (TGF- β) [14] in den peripheren Atemwegen.

Bei COPD-Patienten wird eine Zunahme der Anzahl der Makrophagen in den Atemwegen, im Lungenparenchym, in der BAL und im Sputum beschrieben [167]. Bei einer inflammatorischen Reaktion können Makrophagen durch inhalative Schadstoffe [13] oder bakterielle Produkte wie LPS aktiviert werden und verschiedene Mediatoren produzieren und sezernieren. Dazu gehören neben chemotaktischen Faktoren für Neutrophile wie Leukotrien B₄ (LTB₄) [13] und IL-8 [13] auch Sauerstoffradikale [13], „monocyte-chemoattractant protein-1“ (MCP-1) [167] und Zytokine wie TNF- α [13], welche die Produktion von weiteren Zytokinen und Chemokinen durch inflammatorische Zellen induzieren und so den inflammatorischen Prozess unterstützen. Die durch Alveolarmakrophagen sezernierten Proteasen sind an der Zerstörung des Lungenparenchyms ursächlich beteiligt [167]. Die Aufnahme apoptotischer Neutrophiler supprimiert nicht nur die Abgabe von proinflammatorischen Mediatoren wie IL-1 β , GM-CSF, IL-8 und TNF- α durch Makrophagen, sie steigert zusätzlich die Freisetzung von Mediatoren wie TGF- β und Prostaglandin E₂ (PGE₂) [72], welche einen suppressiven Einfluss auf die Inflammationsreaktion besitzen.

Neutrophile nehmen eine bedeutende Funktion in der Pathogenese der Atemwegsinflammation der COPD ein [21], wenngleich deren Rolle und auch der Mechanismus der neutrophilen Inflammation bei der COPD noch weitgehend unklar ist. Studien zeigten, dass die Anzahl der Neutrophilen in Bronchialbiopsien und

induziertem Sputum mit der Krankheitsschwere und der Rate der abnehmenden Lungenfunktion korrelieren [167].

Während des Inflammationsprozesses kommt es zu einer überwiegenden frühen neutrophilen Infiltration. Der hohe Anteil aktivierter Neutrophiler im Sputum [85] und in der BAL von COPD-Patienten [14] im Vergleich zum Lungenparenchym, reflektiert eine schnelle transendotheliale Migration [13]. Bei der neutrophilen Rekrutierung spielen Adhäsionsmoleküle eine Rolle [54], welche den Migrationsprozess in das Entzündungsgebiet begünstigen. Adhäsionsmoleküle werden durch exogene Schadstoffe, endotheliale und epitheliale Zellsignale sowie durch inflammatorische Mediatoren wie zum Beispiel durch Zytokine aktiviert [13]. IL-1 β fördert gemeinsam mit TNF- α die Expression von Adhäsionsmolekülen auf Zelloberflächen. Zusätzlich enthalten Neutrophile spezifische Regulationsmechanismen, um die Expression von Adhäsionsmolekülen zu kontrollieren. Die neutrophile Einwanderung aus der Zirkulation zum Ort der Inflammation in die Atemwege und ins Lungenparenchym von COPD-Patienten wird zusätzlich durch die zunehmende Liberation von Chemokinen und chemotaktischen Zytokinen unterstützt. Andere Mediatoren wie Lipidmediatoren und „reactive oxygen species“ (ROS) kontrollieren zusätzlich die neutrophilen Funktionen [128].

Neutrophile können durch eigene chemotaktische Signale zur Rekrutierung anderer Zellen zum Ort der Inflammation beitragen und andere Zelltypen zur Freisetzung von chemotaktischen Stoffen stimulieren. So verstärken sie zum Beispiel den inflammatorischen Prozess durch die Sekretion von Zytokinen wie IL-8 [14], TNF- α [189], IL-1 β [189] und anderen Mediatoren wie zum Beispiel Proteasen [188] und Sauerstoffradikalen [188]. Serinproteasen sind potente Sekretagoga durch Stimulation submuköser Drüsen und Becherzellen [14].

Neutrophile eliminieren direkt oder indirekt endogene und exogene Agentien, was eine Apoptose und die Phagozytose durch Makrophagen nach sich zieht [128].

GM-CSF zum Beispiel [13] inhibiert, wie auch LPS, die neutrophile Apoptose und steigert eine Reihe neutrophiler Funktionen [72].

Die Rolle der T-Lymphozyten in der Pathophysiologie der COPD ist noch nicht eindeutig geklärt. Es zeigt sich eine Zunahme der totalen Anzahl der T-Lymphozyten im Lungenparenchym und in den peripheren und zentralen Atemwegen von COPD-Patienten mit einem größeren Anteil von CD8-positiven T-Lymphozyten als CD4-positiven T-Lymphozyten [14]. CD8-positive T-Zellen stellen eine weitere Quelle von Mediatoren, wie zum Beispiel TNF- α , Interferon- γ (IFN- γ) und Proteasen, mit dem

Potential zur Lungenschädigung dar [90]. CD8-positive T-Lymphozyten sind typischerweise bei Atemwegsinfektionen vermehrt nachzuweisen [14].

Im Gegensatz zu anderen Ergebnissen beschreiben einige Autoren eine zunehmende Anzahl von Eosinophilen in den Atemwegen und in der BAL von Patienten mit stabiler COPD [13]. Vor allem während der akuten Exazerbation der COPD wurde von erhöhten Eosinophilen in Bronchialbiopsien und BAL berichtet [13]. Neben IL-5 inhibiert GM-CSF die Rate der eosinophilen Apoptose [72].

Inflamationsprozess

Die von stimulierten Alveolarmakrophagen gebildeten «early response cytokines» IL-1 β und TNF- α stehen am Anfang der inflammatorischen Kaskade und regen neben der Regulation der Expression von Adhäsionsmolekülen sowie Selektinen im und um den Entzündungsherd herum weitere Zellen zur Zytokin- und Chemokinproduktion an [67]. Selektine, Adhäsionsmoleküle, chemotaktische Zytokine wie IL-8 oder zum Beispiel LTB₄ [76] ermöglichen den Durchtritt der aktivierten inflammatorischen Zellen durch das Gefäßendothel und die Migration entlang eines chemotaktischen Gradienten zum Entzündungsherd [67]. Im weiteren Ablauf der Entzündungskaskade kommt es zur transkriptionellen Regulation zusätzlicher Entzündungsmediatoren. Aktivierte inflammatorische Zellen, aber auch Epithelzellen, Fibroblasten, Endothelzellen und glatte Muskelzellen synthetisieren nach Aktivierung zellulärer Transkriptionsfaktoren wie AP-1 und NF- κ B folgende für die COPD charakteristische proinflammatorische Zytokine und Chemokine: TNF- α , IL-1 β , GM-CSF, zum Teil IL-6, IL-8, „growth-regulated-oncogene- α “ (GRO- α), „macrophage-inflammatory protein-1 α “ (MIP-1 α) und MCP-1 [14].

Aber auch Lipidmediatoren, Peptidmediatoren, reaktive Sauerstoffmetaboliten, Stickstoffmonoxid (NO), Wachstumsfaktoren und antiinflammatorische Zytokine unterhalten eine intensive Entzündungsreaktion [14].

Des Weiteren kommt es zu einer verstärkten Sekretion von Proteasen, welche neben den Oxidantien zur Gewebsdestruktion beitragen.

Oxidativer Stress ist durch einen Überschuss an reaktiven Sauerstoffmetaboliten gekennzeichnet. Bei „reaktiven Sauerstoffmetaboliten“ handelt es sich um Formen des Sauerstoffs mit Potential zur Schädigung von Proteinen, Lipiden und Nukleinsäuren [14]. Oxidativer Stress hat einen wesentlichen Anteil an der Pathogenese der COPD [134, 100] und resultiert aus der zunehmenden Last von inhalierten exogenen Oxidantien wie Zigarettenrauch [14] und Umweltschadstoffen und der zunehmenden endogenen Produktion reaktiver Sauerstoffmetaboliten von verschiedenen inflammatorischen und strukturellen Zellen der Atemwege [14].

Normalerweise kommt es bei einer Belastung durch Radikale zur Aktivierung protektiver Mechanismen wie antioxidativer Gene [99].

Oxidativer Stress führt bei der COPD über die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren wie NF- κ B und AP-1 zu einer zunehmenden Expression von proinflammatorischen Genen in der Lunge [100], wodurch die inflammatorische Kaskade fortgesetzt wird. Bei der COPD geht die Balance zwischen proinflammatorischer und antiinflammatorischer Genexpression zum Nachteil der protektiven Mechanismen verloren, so dass eine Schädigung resultiert.

Nicht zuletzt werden durch Verlust oder Veränderung der Epitheloberfläche auch sensorische Nervenenden freigelegt und somit neurogene Pathomechanismen der Entzündungsreaktion durch Freisetzung von Neurotransmittern wie zum Beispiel Tachykininen wie SP angeregt, die wiederum die inflammatorische Reaktion modulieren können.

Bei in der Summe mutmaßlich überwiegenden proinflammatorischen Einflüssen [72] resultieren wiederholte Zyklen der Verletzung und Regeneration („remodeling“) des Atemwegsepithels. Veränderungen der Muzin-produzierenden epithelialen Komponenten gehen mit einer Alteration der Atemwegssekretion einher. Anfänglich führt die Beeinträchtigung des mukoziliären Systems [1] zu chronischem Husten. Bei der fortgeschrittenen COPD kommt es zur peripheren Atemwegsobstruktion infolge einer luminalen Obstruktion durch Mukus, zur Wanddestruktion der Alveolen und zur Reduktion des pulmonalen Kapillarnetzes. Dies reduziert die Möglichkeit zum Gasaustausch, was eine Hypoxämie und später eine Hyperkapnie nach sich ziehen kann. Es kommt zu extrapulmonalen Manifestationen wie zum Beispiel zur Kachexie und zunehmender kardiovaskulärer Mortalität.

1.2 Physiologie der tracheobronchialen Sekretion

1.2.1 Mukus

Mukus dient als Schutz des unterliegenden respiratorischen Epithels vor Dehydration, Pathogenen und Irritantien [95].

Dieser hochvisköse Schleim ist eine Mischung aus den Produkten verschiedenster Zellen und rekrutiert sich hauptsächlich aus Becherzellen und aus mukösen und serösen Zellen der submukösen Drüsen [95, 140]. Mukus besteht aus Glykoproteinen, Peptiden, Glukosaminoglykanen, Lipiden, Antiproteasen und Antioxidantien sowie anderen Komponenten wie Ionen, Wasser, Mediatoren der Inflammation und Serumproteinen [81].

In den peripheren Atemwegsabschnitten geht das hochprismatische Epithel der tracheobronchialen Atemwege in ein säulenförmiges mit nur noch vereinzelt und kürzeren Zilien über.

Im distalen Teil des Respirationstraktes ab den terminalen Bronchioli finden sich Basalzellen und zusätzlich sekretorische Clara-Zellen, welche dort Hauptsekretoren [82] darstellen und Surfactant [114] produzieren.

Becherzellen finden sich im gesamten Tracheobronchialsystem, mit einer Dichte von 6000 Zellen pro 1 mm^2 [82]. Sie bilden in den proximalen Atemwegen ihren größten Anteil. In den Bronchioli sind sie nur noch sehr spärlich vorhanden [82].

Die Anzahl der Becherzellen steigt eindrucksvoll als Antwort auf Zigarettenrauch, irritative Gase, Proteinasen, inflammatorische Mediatoren wie Zytokine und bakterielle Produkte [139] an. Dies geht mit zunehmender Muzin (MUC)-Genexpression einher.

In der humanen Trachea und in den Bronchien, überall wo Knorpelgewebe anzutreffen ist, gibt es zahlreiche submuköse Drüsen [82]. In den großen Atemwegen produzieren sie den überwiegenden Anteil des respiratorischen Schleims [82]. Submuköse Drüsen setzen sich aus serösen und mukösen Zellen zusammen. Muköse Zellen in submukösen Drüsen produzieren sauren Mukus und die serösen Zellen der submukösen Drüsen pH-neutralen Mukus [80].

Einzelne sezernierende Strukturen unterscheiden sich zwischen den verschiedenen Spezies, wie auch das Verhältnis der einzelnen Zelltypen zueinander. Das Verhältnis der Sekretionsprodukte von submukösen Drüsen zu Becherzellen in den großen Atemwegen beim Menschen beträgt etwa 40:1 [140].

Die Mukuseigenschaften variieren entlang der Atemwege. In den distalen Atemwegen findet sich Mukus mit einem niedrigeren Molekulargewicht und niedriger Viskosität, da es Surfactant und Proteine von Clarazellen beinhaltet. Die Sekretionsprodukte innerhalb der submukösen Drüsen variieren ebenfalls.

Die bronchialen Sekrete bilden an der epithelialen Oberfläche zwei Schichten: die Sol-Phase und die Gel-Phase [119]. Die Zilien selbst sind von einer niederviskösen Solphase umgeben, welche verhältnismäßig wenig Muzin enthält. Die auf der Sol-Phase schwimmende Gel-Phase besteht aus visköserem Sekret. Kinozilien, die bis in die hochvisköse Gel-Phase ragen, befördern das Bronchialsekret mit Fremdpartikeln und Pathogenen oralwärts [114] („mucoziliäre Clearance“).

1.2.2 Muzin

Muzine sind hochmolekulargewichtige Glykoproteine, und als Hauptkomponente des Mukus [89] verleihen diese Makromoleküle dem Atemwegsmukus viskoelastische Eigenschaften [89]. Sie spielen eine wichtige Rolle für die effektive Abwehrfunktion des Mukus [89], aber sie repräsentieren auch eine entscheidende Ursache der Obstruktion [62].

O-Glykosylierung:

Aktivierte Transkriptionsfaktoren steigern die Expression der MUC-Gene im Kern. An Ribosomen werden neue MUC-Transkripte zu MUC-Proteinen kodiert und kotranslational in das Endoplasmatische Retikulum (ER) geschleust [143].

Die O-Glykosylierung der zentralen Proteinkette findet posttranslational im cis-Golgi statt, wo Polypeptid-N-Acetylgalactosaminyltransferase die Bindung von N-Acetylgalactosamin (GalNAc) an Serin oder Threonin katalysiert, sobald eine naszierende MUC-Polypeptidkette im Golgi-Apparat vorliegt [143]. Die Übertragung von GalNAc verändert wahrscheinlich die Form des globulären Apomuzins, welches nun zu einem eher linearen Molekül wird [143], was die nachfolgenden Übertragungen erleichtert. An jedes O-Glykan werden entweder Hexosen [Galaktose (Gal), N-Acetylglukosamin (GlcNAc), Fucose] oder Sialinsäure durch spezifische Glykosyltransferasen (GT) [143] schrittweise angelagert. O-Glykan Ketten können so terminal durch Addition von Fucose, Sialinsäure oder Sulfat genauso wie Blutgruppenderminanten glykosyliert werden. Mittlerweile konnten bereits mehr als 30 GT nachgewiesen werden, von denen mindestens ein Dutzend an der Synthese von Muzin-O-Glykanen beteiligt ist [143].

Durch die Anbindung von Sialinsäurebausteinen und Sulfaten an Gal- oder GlcNAc-Strukturen mit konsekutiver Erweiterung der Core-Strukturen erhalten Muzine eine negative Ladung, woraus sich ihr niedriger pH-Wert ergibt [143]. Die Anlagerung von Fucose bringt eine Hydrophobierung mit sich. Terminale Zucker tragen aufgrund von Hydrophobierung oder ihrer Ladung zu den Eigenschaften von Muzinen und rheologischen Eigenschaften des Mukus bei [143].

Ein MUC-Proteingerüst besteht typischerweise aus einer NH₂-terminalen Domäne, einer oder mehreren zentralen Domänen mit einer hohen Anzahl an „tandem repeat“ (TR)-Domänen sowie einer terminalen COOH-Domäne.

Die N- und C-terminalen Enden tragen überwiegend N-Glykosylierungen und sind cysteinreich [156].

In den TR-Domänen sind zahlreiche O-Glykane an Threonin- oder Serinreste angelagert. O-Glykane weisen eine heterogene Größe auf [143].

Muzine sind klassifiziert durch ihr Proteingerüst, welches durch ein MUC Gen verschlüsselt ist. Die TR-Domänen sind die charakteristischen Merkmale, welche Muzine von anderen Glykoproteinen unterscheiden. Die Länge [143] und die Anzahl [143] der O-Glykosylierungs-Domänen variieren zwischen den Muzinen und jede Domäne enthält wiederholte Sequenzfolgen, die erwähnten „tandem repeats“ [95]. Wahrscheinlich tragen zur strukturellen und funktionellen Ungleichheit der Muzine diese Sequenz- und Längenpolymorphie mit Zunahme der Molekularmasse und additionalen Veränderungen an N-und C-terminalen Enden bei.

Muzine besitzen so ein hohes Molekulargewicht von mehr als $2\text{-}20 \times 10^5$ Dalton (Da), die sich von 50 bis zu 90% aus Kohlenhydraten [143] zusammensetzen.

Die Kohlenhydratketten-Ungleichheit erlaubt Interaktionen zwischen Muzinen und Mikroorganismen und spielt eine Hauptrolle in der Abwehr der Atemwege [144].

Sekretion:

Die Muzinsekretion kann, im Gegensatz zur Muzinbiosynthese, welche eine Zeitdauer von 6-24 Stunden erfordert, innerhalb von Sekunden bis Minuten erfolgen [143].

Die Sekretion erfolgt entweder über einen Weg oder über eine Kombination von zwei Wegen [63].

Der konstitutive Weg erfolgt ohne Speicherung der Granula und ist nicht rezeptorvermittelt. Die kontinuierliche Sekretion von kleinen Mengen Mukus dient hauptsächlich der Protektion der Atemwege [63]. Bei den Becherzellen werden zum Beispiel die peripheren Sekretgranula konstitutiv sezerniert.

Andererseits erfolgt die Sekretion über einen regulierten Weg [63] mit, nach erfolgter posttranslationaler Modifikation, Konzentrierung der Proteine innerhalb von Golgi-Vakuolen und Speicherung in sekretorischen Granula. Hierbei lagern die Muzine in gestapelter Form in Sekretgranula und die Ausscheidung der Glykoproteine wird nach einer Stimulation durch ein Sekretagogum an der apikalen Oberfläche verursacht [63]. Die Sekretfreisetzung über den regulierten Weg steht unter der Kontrolle eines Signal-Transduktionsweges, welcher es erlaubt, dass externe Stimuli, die an der Plasmamembran über entsprechende Rezeptoren aufgenommen werden, intrazellulär umgesetzt werden, damit sich der intrazelluläre Speicher entleeren kann [174]. Verschiedene Stimuli wie Proteinasen, Irritantien, inflammatorische Mediatoren, ROS, Nervenaktivierung / Neurotransmitter, Veränderung der biophysikalischen Umgebung [136] sowie bakterielle Stoffwechselprodukte können als Muzin-Sekretagoga fungieren.

Die Fähigkeit der sezernierten Muzine, durch intermolekulare Disulfidbrücken cysteinreicher Domänen der N- und C-terminalen Regionen Oligomere zu bilden, trägt essentiell zur Bildung der Gelstruktur des Mukus bei [157].

Muzin Klassifikation:

Die Klassifikation erfolgt in sekretorische und membrangebundene Muzine. Die sekretorischen, oligomeren [77] Muzine weisen eine hohe Dichte auf. Sekretorische Muzine werden weiter in cysteinreiche und cysteinarme unterschieden. Membrangebundene, monomere-oberflächenassoziierte Muzine [77] mit niedriger Dichte enthalten eine transmembranäre und eine kurze zytoplasmatische Domäne [142].

Tabelle 1.2 Klassifikation humaner Muzine

Klassifikation	Muzin
Membrangebunden Muzine mit TR	MUC3A , MUC3B, MUC1, MUC4, MUC11, MUC12, MUC13, MUC16, MUC17, MUC20
Sekretorische cysteinreiche Muzine mit TR	MUC6, MUC2, MUC5AC, MUC5B, MUC19
Sekretorische cysteinarme Muzine mit TR	MUC7, MUC8, MUC9
Muzine ohne TR	MUC14, MUC15, MUC18

[143]

Muzin Gen-Expression:

Im Gesunden werden im unteren Respirationstrakt 12 [169] humane Muzingene exprimiert: MUC1, MUC2, MUC4, MUC5AC, MUC5B, MUC7, MUC8, MUC11, MUC13; MUC15, MUC19, MUC20 [169, 143].

Die im Vordergrund stehenden zellulären Quellen von Muzinglykoproteinen in den Atemwegen sind Becherzellen im Oberflächenepithel und muköse Zellen in submukösen Drüsen [62, 89].

Die Becherzellen der Atemwege exprimieren neben MUC2 [169] hauptsächlich MUC5AC mRNA [143, 169].

Eine MUC5B Muzin-Gen-Expression in Becherzellen bei einem gesunden Erwachsenen wird als atypisch beschrieben, wobei hier diskrepante Angaben existieren [143].

MUC5AC stellt zusätzlich ein Muzin von submukösen mukösen Zellen dar [95].

Die Expression des sekretorischen Muzins MUC5B wird mit den mukösen Zellen [95] der submukösen Drüsen [143, 169, 95] in Verbindung gebracht. Zusätzlich wird MUC8 [95, 169, 143] und MUC19 [143, 169] durch submuköse Drüsen exprimiert. Der Nachweis der Expression von MUC7 gelang in serösen Zellen submuköser Drüsen [169, 95].

1.2.3 Neuronale Kontrolle der Mukussekretion der Atemwege

Die Innervation der Atemwege umfasst einen afferenten sensiblen, sensorischen Teil sowie einen autonomen efferenten Teil.

Die Muzinsekretion unterliegt einem komplexen Netzwerk von neuronalen, neuroendokrinen und parakrinen Kontrollmechanismen.

Zu den neuronalen Mechanismen gehören parasymphatische cholinerge, sympathisch adrenerge und NANC Mechanismen, welche in Abhängigkeit von der Spezies zur Sekretion von zum Beispiel submukösen Drüsen und Becherzellen beitragen [140].

Es gibt Hinweise aus experimentellen Studien, dass Mukushypersekretion bei verschiedenen bronchialen Erkrankungen Folge einer Beeinträchtigung der neuronalen Kontrolle sein kann [140].

Eine komplexe Beziehung zwischen Inflammation und neuraler Kontrolle der Atemwege wird zunehmend thematisiert.

1.2.3.1 Cholinerge Regulation

In den Atemwegen der Säugetiere ist die vorherrschende neuronale Kontrolle der Mukussekretion cholinerg [163, 137].

Die präganglionären cholinergen Fasern ziehen im Nervus vagus zu den lokalen parasymphatischen Ganglien der Atemwege. Von dort ziehen kurze postganglionäre Nervenfasern zu den Zielgebieten wie den bronchialen Drüsen [179].

In der Umgebung submuköser Drüsen konnten elektronenmikroskopische Untersuchungen cholinerge Nervenplexus vagalen Ursprungs nachweisen, welche auch in enger Nachbarschaft zu serösen und mukösen Zellen lokalisiert waren [120].

Im Speziesvergleich weist die Verteilung der cholinergen parasymphatischen Nervenfasern und ihrer Mediatoren Unterschiede auf.

Acetylcholin (ACh) ist der klassische Mediator der prä- und postganglionären parasymphatischen Neurone und bindet an nicotinerge und muscarinerge Rezeptoren. Von den muscarinergen (M-Rezeptoren) Rezeptoren sind drei Subtypen mit unterschiedlicher Verteilung in der Lunge bekannt [163, 179, 16]. Neben dem auf

submukösen Drüsen vorherrschenden Rezeptor M_3 [16, 179] wurden auch M_1 -Rezeptoren auf submukösen Drüsen nachgewiesen [16].

Cholinerge Agonisten können zu einer Kontraktion myoepithelialer Zellen führen und somit die Entleerung der Drüsenzellen beeinflussen [104].

Die Bedeutung der parasympathischen Regulation der Sekretion submuköser Drüsen wurde durch viele Studien bekräftigt [120, 104].

Eine elektrische Stimulation des N. vagus verursachte so die Freisetzung von ^{35}S gebundenen Muzinen in das tracheale Lumen von Katzen, erhöhte die sekretorische Antwort von submukösen Drüsen in der Hundetrachea und das Volumen von Sekretsammlungen über die Mikropipetten-Methode submuköser Drüsen von Katzen [120]. Eine Vorbehandlung mit Atropin verhinderte die Antwort der vagalen Stimulation in allen Studien.

Nachdem die elektrische Stimulation von Nerven in der Katzentrachea *in vitro* zunehmende Hillocksformation von Tantalstaub über den submukösen Drüsen bewirkte, ließ sich dieser Effekt durch die vorherige Gabe von Tetrodotoxin, einem Nervengift, verhindern [120].

Des Weiteren konnte die Präsenz von cholinergen Rezeptoren auf sekretorischen Atemwegszellen durch den stimulatorischen Effekt von cholinergen Agonisten auf den Output von Muzinglykoproteinen und radioaktiv markierten Muzinen von submukösen Drüsen *in vitro* aufgezeigt werden [120].

Ebenfalls konnte ein stimulierender Effekt von cholinergen Agonisten mit der Hillock-Methode und der Mikropipetten-Methode von submukösen Drüsen *in vivo* nachgewiesen werden [120].

Die Sekretionen seröser sowie muköser Zellen submuköser Drüsen können im Gegensatz zu Becherzellen durch cholinerge Agonisten potent stimuliert werden [17]. In der Frettchentrachea überwiegen die submukösen Drüsen und in der Meerschweinchentrachea die Becherzellen. ACh stellt ein potentes Sekretagogum der Frettchentrachea dar, wohingegen ein geringerer Einfluss auf die Meerschweinchentrachea nachgewiesen wurde [88].

Die cholinerge Neurotransmission kann durch inflammatorische Mediatoren gesteigert werden [10].

1.2.3.2 Adrenerge Regulation

Die adrenerge Innervation nimmt in humanen Atemwegen eine untergeordnete Rolle ein [88, 163].

Sympathische präganglionäre Fasern ziehen zusammen mit motorischen Fasern vom Rückenmark zu den cervikalen und thorakalen Grenzstrangganglien. Postganglionäre sympathische Axone ziehen vom Ganglion cervicale superius und medius sowie Ganglion stellatum zur Lunge.

Adrenerge Nervenfasern finden sich in enger Nachbarschaft zu submukösen Drüsen [163]. Die sympathische Innervation der Atemwege weist erhebliche Speziesunterschiede auf [120].

Die fehlende sekretorische Antwort gegenüber adrenergen Agonisten bei Gänsen [120], Kaninchen [120] und Meerschweinchen [120] mag auf spärlich entwickelte submuköse Drüsen zurückzuführen sein.

Speziesunterschiede sind auch auf die sympathische Faserdichte zurückzuführen [55].

Transmitter der präganglionären Neurone ist ACh. Neben Neuropeptid Y (NPY) ist der klassische postganglionäre Überträgerstoff des Sympathikus Noradrenalin [163]. Noradrenalin aktiviert α - und β -adrenerge Rezeptoren. NPY ist ein Cotransmitter von Noradrenalin und ein Teil des e-NANC-Systems [163].

Die elektrische Stimulation von sympathischen Nerven bei Katzen förderte die Abgabe von radioaktiv markierten Glykoproteinen in die Trachea [120].

Eine elektrische Stimulation von Trachealsegmenten bei Frettchen [120] bewirkte trotz der Verabreichung von Atropin eine weitere Sekretion von submukösen Drüsen. Die restliche sekretorische Antwort konnte durch Gabe von Tetrodotoxin als Indiz eines durch Nerven vermittelten Effektes verhindert werden. Der Effekt war durch die Vorbehandlung mit dem nichtselektiven Alphablocker Phentolamin ebenfalls inhibierbar, so dass die Präsenz von α -adrenergen Rezeptoren auf sekretorische Zellen vermutet wurde [120].

Der stimulatorische Effekt des Alphaagonisten Phenylephrin bestätigte sich durch die Freisetzung von sulfatierten Muzinen bei der Katzentrachea und bei der humanen Trachea *in vitro* und durch die Sekretproduktion aus submukösen Drüsen von Hunden und Katzen *in vivo* [120].

An isolierten Drüsen der Katzentrachea gelang der Nachweis von α_1 - und α_2 -Rezeptoren [47]. Glykoproteine wurden vor allem nach Aktivierung der α_1 -Rezeptoren sezerniert. α_2 -Agonisten dagegen reduzierten die β -adrenerge Sekretion [47].

Präjunktionale α_2 -Rezeptoren (Autorezeptoren) können die Freisetzung von Norepinephrin und NPY von adrenergen Nerven, die Freisetzung von Tachykininen von sensorischen Nerven und die cholinerge Neurotransmission inhibieren [163].

Die Sekretion seröser Zellen wird durch α -adrenerge und cholinerge Agonisten potenter stimuliert als durch β -adrenerge Agonisten [17]. Sekretionen muköser Zellen wiederum werden durch β -adrenerge und cholinerge Agonisten potenter stimuliert als durch α -adrenerge Agonisten [17].

β_1 - und vor allem β_2 -Rezeptoren [18] ließen sich in der Lunge auf submukösen Drüsen nachweisen [36].

Adrenergika und Cholinergika zeigten keine eindeutige Stimulation der Becherzellsekretion [17].

1.2.3.3 Sensible / Sensorische Regulation

Nach morphologischen und physiologischen Kriterien wird eine Unterteilung in myelinisierte A-Fasern und unmyelinisierte C-Fasern vorgenommen [42].

Sensibel versorgende Fasern verlaufen im Nervus vagus und zu einem kleineren Anteil auch zusammen mit sympathischen Nervenfasern [42]. Unmyelinisierte C-Fasern verlaufen in der Atemwegsmukosa [182].

Fünf verschiedene Rezeptortypen werden mit den Atemwegen in Verbindung gebracht [182]. Je nach Rezeptortyp gibt es Unterschiede hinsichtlich der Sensitivität und Reflexantwort. Hinsichtlich der Reflexantwort kommt es je nach spezifischem Reiz über die „rapidly adapting pulmonary stretch receptors“ (RARs, A δ -Fasern), die Rezeptoren der pulmonalen C-Fasern und die Rezeptoren der bronchialen C-Fasern zur Mukussekretion [182].

Die Stimulation der C-Fasern führt zu einer direkten Freisetzung von sensorischen Neuropeptiden (Tachykininen), die in den afferenten Nervenendigungen lokalisiert sind und eine neurogene Inflammation verursachen [182]. Neuropeptide können aber auch durch die Erregung efferenter Fasern über den lokalen Reflexbogen freigesetzt werden.

1.2.3.4 Non-adrenerge, non-cholinerge (NANC) Regulation

Unter elektrophysiologischer Stimulation des Vagusnerven und gleichzeitiger Anticholinergika- und Antiadrenergika-Gabe ließ sich die Schleimsekretion an Katzentracheen nicht vollständig supprimieren [127].

Neben den bereits erwähnten klassischen Transmittern des peripheren Nervensystems existieren außerdem Mediatoren, die ausgeprägte Effekte unter anderem auf die Drüsensekretion [127] und Entzündungszellen zeigen. Diese Neurotransmitter gehören zu keinem morphologisch eingrenzbaaren Nervensystem und lassen sich einem eigenständigen neuralen Regulationssystem zuordnen, welches unter dem Begriff

NANC zusammengefasst wird. Das NANC-System benutzt die morphologischen Strukturen des autonomen Nervensystems und interagiert dabei funktionell mit den klassischen neuronalen Mechanismen.

Aufgrund der unterschiedlichen Effekte der Mediatoren wurde eine Aufteilung des NANC-Systems hinsichtlich der Wirkung auf die glatte Bronchialmuskulatur in einen inhibitorischen (i-NANC) und einen exzitatorischen (e-NANC) Teil vorgenommen [180].

„Orthodromes“ efferentes NANC-System:

Die dazugehörigen Neurotransmitter besitzen teilweise unterschiedliche pharmakologische Wirkungen.

Folgende Neurotransmitter, welche vor allem in cholinergen und teilweise auch in adrenergen Nervenfasern [133] kolokalisiert sind, stimulieren neben anderen Effekten die Mukussekretion: VIP [163, 133], NO [163], Galanin [133], „peptide histidine methionine“ (PHM) [133] und „peptide histidine isoleucine“ (PHI) [133].

NPY, welches zusammen mit Noradrenalin in adrenergen Nervenfasern vertreten ist, zeigt ebenfalls Einfluss auf die Mukussekretion [133].

VIP und NO inhibieren präjunktional eine ACh-Freisetzung [163].

„Sensorisch efferentes“ NANC-System

Dieser Teil des NANC-Systems ist eine Population afferenter C-Fasern [133].

Diese Fasern können durch Irritantien [12], Zigarettenrauch, Epithelschädigung, Capsaicin und endogene Substanzen wie inflammatorische Mediatoren [12] stimuliert werden. Die Aktivierung der sensorischen C-Fasern bewirkt eine Freisetzung von Neurotransmittern wie den Tachykininen SP und NKA sowie zum Beispiel CGRP [133]. „Sensorische Neuropeptide“ können nach ihrer Liberation die „neurogene Inflammation“ einleiten, was auch von einer Stimulation der Mukussekretion begleitet sein kann [182].

Zusätzlich zu den genannten Neuropeptiden können sensorische Nervenfasern [12] auch VIP [133] und Galanin [12, 133] enthalten.

1.3 Pathophysiologie der bronchialen Sekretion bei der COPD

Mukushypersekretion der Atemwege ist charakteristisch für die COPD mit der klinischen Manifestation von wiederholtem Husten und Expektoration [158a]. Als Risikofaktor für die Entwicklung einer COPD kann Mukushypersekretion die progressive Abnahme der Lungenfunktion, also eine Abnahme der FEV1, bewirken [164b]. Mukus

stellt eine protektive Barriere gegenüber Keimen und Toxinen dar. Muzinglykoproteine, als Hauptkomponente des Mukus, sind ein wichtiger Teil des angeborenen Immunsystems des Respirationstraktes und der mukoziliären Clearance [143].

Mukushypersekretion in den Atemwegen resultiert aus einer erhöhten Produktion durch die Überexpression von Muzingenen [2, 142]. Sekundär spielen histomorphologische Veränderungen sekretorischer Zellen sowie die Hypersekretion von gespeichertem Muzin durch Becherzellen und submuköse Drüsen eine Rolle [2].

Das Atemwegsepithel kann den Kontakt zu Pathogenen, inhalativen Schadstoffen und Mediatoren aktivierter inflammatorischer Zellen mit einer Mukushypersekretion beantworten [142]. Muzin-Überproduktion und Muzinhypersekretion kehren, vermutlich als Reaktion auf anti-inflammatorische Mechanismen, typischerweise innerhalb von Tagen auf ein basales Level zurück [143].

Die Mediatoren der COPD beeinträchtigen das Atemwegsepithel, aktivieren strukturelle Umbauprozesse und beeinflussen die MUC-Gen-Regulation. Die hauptsächlichen pathologischen Merkmale der chronischen Bronchitis sind eine Hyperplasie von Becher-Zellen und eine Hypertrophie submuköser Drüsen [83]. Zusätzlich kann man eine Becherzellmetaplasie bis in die peripheren Atemwege beobachten, was zur Entwicklung einer Obstruktion beiträgt [83].

Dem Inflammationsprozess bei der COPD kommt eine maßgebliche Rolle im Rahmen der Mukushypersekretion zu [62a,146]. Hierauf soll im Folgenden näher eingegangen werden.

Virale Infektionen, Zigarettenrauch und Luftschadstoffe induzieren bei der COPD einen Inflammationsprozess, bei welchem Neutrophile eine führende Rolle einnehmen. Bakterielle Nebenprodukte regulieren die Muzingenexpression und können wie auch Zigarettenrauch und andere Luftschadstoffe eine Metaplasie sekretorischer Zellen induzieren [143]. Zudem triggern verschiedene Bakterien eine Exacerbation einer chronischen Bronchitis.

Die bei der COPD vorherrschenden Zytokine regulieren offenbar ebenfalls die Muzingenexpression und zeigen Einfluss auf die Entwicklung einer Metaplasie sekretorischer Zellen. Zytokine zeigen spezifische Funktionen bezüglich der Immun- und Epithelzellen. Vermutlich interagieren manche Mediatoren mit Luftschadstoffen, infektiösen Agentien und / oder neutrophilen Mediatoren synergistisch, um Umbauprozesse zu beeinflussen, die zur Überproduktion und Hypersekretion von Muzinen führen [143].

Die Expression von Muzinen der Atemwege wird auf transkriptionellem und posttranskriptionellem Level reguliert.

Inflammatorische Mediatoren haben die Fähigkeit, die Expression beziehungsweise Aktivität von Enzymen zu fördern, welche für die Muzinbiosynthese erforderlich sind [143]. Weiterhin binden Zytokine sowie Lipidkomponenten grampositiver oder gramnegativer Bakterien an spezifische Rezeptoren der Zellmembranen, welche direkt oder indirekt den MAPK-Signalweg aktivieren, um wiederum über aktivierte Transkriptionsfaktoren (NF κ B, AP-1, SP1) [128] die transkriptionelle Muzingenexpression hochzuregulieren [143]. Dabei kann bei Zytokinen die Aktivierung des „epidermal growth factor receptor“ (EGF-Rezeptor, EGFR) eine Rolle spielen. Der Einfluss auf die Transkription [143] und eine posttranslationale Modifikationen sind bedeutend für eine Abwehrfunktion, zum Beispiel während der akuten Exacerbation einer COPD.

Die COPD ist mit einer zunehmenden Expression von MUC5B im Bronchiallumen und von MUC5AC im Bronchialepithel assoziiert [188, 35]. Die MUC5B : MUC5AC Ratio steigt [143].

Im Gegensatz zu Kontrollen konnte man bei der COPD eine Expression von MUC5B mRNA in Becherzellen nachweisen [143].

IL-6 [169], IL-8 und Interleukin 17 (IL-17) [169] induzieren eine Zunahme der MUC5B mRNA-Expression [143].

Die Zunahme der MUC5AC-Expression in den peripheren Atemwegen repräsentiert eine der ersten Veränderungen in der Muzinexpression bei der COPD [35].

Komponenten bestimmter Bakterien, die Neutrophile Elastase (NE), oxidativer Stress, Zigarettenrauch, TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-17 zeigen Einfluss auf die MUC5AC Expression auf transkriptionellem Level [143]. Auch Interleukin 9 (IL-9) [14, 143], Prostaglandine, Trypsin-artige Proteasen der Atemwege, Kallikrein, Matrixmetalloproteinasen (MMPs) und Luftschadstoffe werden in diesem Zusammenhang erwähnt [169].

Die Aktivierung des EGF-Rezeptors [95] mit der Expression von Muzingenen, im besonderen MUC5AC [143], wurden für Tabakrauch [14], IL-13 [14, 71b], IL-9 [14], reaktive Sauerstoffmetaboliten [14], TNF- α [40], EGF [14] und „transforming growth factor α “ (TGF- α) [14] beschrieben.

Verschiedene inflammatorische Mediatoren wie NE, TNF- α und IL-8 können die MUC5AC-Expression in humanen Epithelzellen auf posttranscriptioneller Ebene durch zunehmende mRNA Stabilität beeinflussen [143, 169].

Aktives Rauchen, wie auch Acrolein [28, 95], eine Komponente des Zigarettenrauches, sind ein Stimulus der zunehmenden Expression von MUC5AC [35, 95].

MUC2 kommt im Sputum bei COPD-Patienten in geringen Mengen vor [35]. Komponenten bestimmter Bakterien [169, 143], bakterielle und virale dsRNA [169],

TNF- α [35, 169, 143], IL-1 β [169, 143] und IL-9 [169, 143] zeigten eine Induktion der Expression von MUC2. Die Aktivierung des EGF-Rezeptors spielt bei der MUC2-Expression ebenfalls eine Rolle [143].

MUC2 mRNA wird ebenfalls über posttranskriptionelle Mechanismen stabilisiert [169, 143].

Durch die gesteigerte Muzinsynthese kommt es zu einer erhöhten Aktivierung der Exozytose-Wege, welche zur Mukushypersekretion führen [183]. Die Exozytose der Drüsenzellen kann durch eine Reihe von Sekretagoga wie cholinerge Agentien, inflammatorische Zellprodukte, Proteasen und Pathogene induziert werden [183]. Innerhalb von Minuten kommt es zu einer Abgabe von sekretorischen Granula aus Becherzellen und submukösen Zellen [143]. Neben einer unspezifischen Stimulation durch mechanische und chemische Reize ist bei der regulierten Sekretion eine spezifische Stimulation durch Aktivatoren der Phospholipase C, wie durch SP, und der Adenylat- und Guanylatzyklase, über VIP beziehungsweise NO, möglich [63]. Inflammatorische Zellen stellen dabei eine potentielle Quelle von Mukussektretagoga dar [63]. Eine anhaltende Hypersekretion erfordert wiederum eine zunehmende Muzinbiosynthese, um die Granulaspeicher wieder aufzufüllen [143].

1.4 Fragestellungen der vorliegenden Arbeit

- 1) Wie verhält sich die tracheale Muzinsekretion bei Fischerratten (F344-Ratten) und Sprague-Dawley-Ratten (SD-Ratten), welche 1, 3, 20 Tage und exemplarisch 2 und 28 Tage gegenüber 10 „parts per million“ (ppm) NO₂ exponiert wurden,
 - a) in Bezug auf die basale tracheobronchiale Sekretion,
 - b) in Bezug auf die stimulierte Sekretion (Acetylcholingabe),

im Vergleich zu Tracheen nicht NO₂-exponierter Tiere und im Speziesvergleich?

- 2) Wie verhält sich die tracheale Muzinsekretion von F344- und SD-Ratten, die 1, 3 und 20 Tage bzw. 3 und 20 Tage gegenüber 10 ppm NO₂ exponiert wurden,
 - a) unter Tachykinin-Stimulation (SP-Gabe),

im Vergleich zu Tracheen nicht NO₂-exponierter Tiere und im Speziesvergleich?

- 3) Wie verhält sich die tracheale Muzinsekretion von F344-Ratten, die 1, 3 und 20 Tage gegenüber 10 ppm NO₂ exponiert wurden,
 - a) unter Zytokin-Stimulation (GM-CSF-Gabe),
 - b) unter kombinierter Tachykinin- und Zytokin-Stimulation (SP-Gabe und GM-CSF- Gabe)

im Vergleich zu Tracheen nicht NO₂-exponierter Tiere?

2 Material und Methoden

2.1 Versuchsvorbereitung

2.1.1 Aufstellung der getesteten Substanzen und der verwendeten Chemikalien

- Acetylcholinchlorid (Merck, Darmstadt; Kat-Nr.: 370732)
- Atropinsulfat kristallin (Merck, Darmstadt; Kat-Nr.: 159508)
- Carbogengas-Druckluftstahlflasche (95% CO₂, 5% O₂), (Messer Griesheim, Siegen; 2020)
- GM-CSF-rat (R+ SYSTEMS; Kat-Nr.: 518-64-005)
- Medium 199 (M199), (Serva, Heidelberg, Deutschland; Kat-Nr.: 47700)
- Natriumsulfat-Na₂SO₄, (Merck, Darmstadt; Kat-Nr.: 106649)
- Natriumhydrogencarbonat NaHCO₃, (Merck, Darmstadt; Kat-Nr.: 6329)
- Penicillin/Streptomycin 10000 U/ 10000 µg/ml, (Seromed Berlin; Kat-Nr.: A 2212)
- Pentobarbital (NARCOREN®) 160 mg/ml, (MERIAL)
- Natriumazid -NaN₃, (Merck, Darmstadt; Kat-Nr.: 106688)
- Stickstoffdioxid - NO₂, (Fa. Messer-Griesheim, Duisburg; Kat-Nr.: 2020)
- Na₂³⁵SO₄, (HWZ: 87,1 Tage), (Amersham -Braunschweig, Germany; SJS1 032)
- Szintillationslösung Lumagel®, (Fa J.T.Baker Chemical-Deventer-Holland; 8581)
- Substanz P (Bachem, H-1890.0001)

2.1.2 Zusammensetzung der verwendeten Lösungen

Tabelle 2.1 Lösungszusammensetzungen

Lösung	Zusammensetzung
ACh	Stammlösung 1mmol/1 ml Aqua destillata
Dialyse-Medium	12g Na ₂ SO ₄ und 4g NaN ₃ in 7L Aqua destillata
Nährmedium 2 Liter:	19,74 g M199 und 4,4 g NaHCO ₃ und 20ml Penicillin/Streptomycin in 1980 ml H ₂ O Aqua destillata
Radioaktivität:	50 µCi Na ₂ ³⁵ SO ₄ (³⁵ S) in 7 ml Nährmedium pro Kammer

2.1.3 Geräte und Zubehör

Tabelle 2.2 Geräte und Zubehör

Anästhetikum (Pentobarbital)
Beheizbare Glas-Perfusionskammern (Glasteile: MRA Company, Clearwater, Florida)
Carbogen-Metall-Druckflasche
Dialysegefäß (7 l Polycarbonatbehälter), Rührmagnet und Magnetrührer
Dialysierschläuche Visking (0,02 mm Wandstärke, 16 mm Durchmesser – 25 mm Breite) Fa Serva Heidelberg
Dreiwegehähne: Japanischer Hersteller, alternativ Metallhähne, (z.B. Discifix®-3, weiß von B. Braun)
Eis zur Mediumaufbewahrung / Hemmung des Bakterienwachstums
Externe Wärmepumpe
Handschuhe
Kolben / Trichter, Rührmagnet und Magnetrührer für Nährlösung
Kondensatfänger zum Verdunstungsschutz
Operationsbesteck (steriles spitzes Skalpell, Metzenbaum-Schere, chirurgische und anatomische Pinzette, gekrümmte Knopfschere), Rippensperrer, Injektionsnadeln, spitze Pinzette, kleine Schere mit gerader und stumpfer Spitze, Schere mit seitlich abgeschrägter Spitze
Silikonplatte (Wacker Chemie GmbH, München / Silgel 601) als Haftboden für Präparationsnadeln
Spritzen – OMNIFIX

Stoppuhr
Tesaband (4 cm breit)
Tupfer (Gaze)
Unterlage /Wärmekissen
Ussing-Kammer (Plexiglas oder ABS Plastik – Eigenproduktion)
Zählflaschen (Polyvials 20 ml; Zinsser, Frankfurt; Kat-Nr.: 3071401) für die Proben zur Messung im β -Counter
β - Counter Rackbeta LKB 1219, LKB Instruments GmbH, Gräfing, D

2.2 Methoden

2.2.1 Versuchstiere

Pathogenfreie männliche F344-Ratten (Inzuchtrate) und SD-Ratten (Auszuchtrate) dienten in der folgenden Arbeit als Versuchstiere*. Die Tiere wurden unter standardisierten Laborbedingungen gehalten. Während des kurz gehaltenen Aufenthaltszeitraumes wurden die Versuchstiere in einer tiergerechten Umgebung gehalten und vom Tierpfleger mit Trinkwasser und Nahrung versorgt. Die Käfigreinigung wurde ebenfalls regelmäßig durchgeführt.

* Das Aktenzeichen dieser Tierversuchsgenehmigung durch das Regierungspräsidium Gießen lautet: II 25.3 – 19c 20/15 (1) 53/98 – MR 20/11 – 1/99 C.

2.2.1.1 Fischerratten (F344-Ratten)

Tabelle 2.3 F344-Ratten

Lieferant:	CHARLES RIVER (Institut für Versuchstierzucht, Hannover, Deutschland)
Geschlecht:	männlich
Gewicht:	155 -180 g

2.2.1.2 Sprague-Dawley-Ratten (SD-Ratten)

Tabelle 2.4 SD-Ratten

Lieferant:	CHARLES RIVER
Geschlecht:	männlich
Gewicht:	200-300 g (max 400g)

2.2.2 Versuchsanlage zur NO₂-Exposition

Zur Frage der Wirkung von NO₂ auf die Atemwege und Lungen wurden die Versuchstiere in einem Zeitraum von 1, 3 und 20 Tagen und darüber hinaus auch exemplarisch von 2 und 28 Tagen gegenüber Stickstoffdioxid inhalativ exponiert.

Hierzu wurden speziell konstruierte transparente PVC-Kästen mit einem Volumen von 57,2 Litern und einer Gas-/Luftzufuhr sowie Entlüftung verwendet. In diesen Kästen wurde je ein Käfig mit maximal drei Tieren positioniert. Die Tiere bewegten sich dabei auf weichem Holzgranulat. Der vordere Deckel des Expositionskastens war abnehmbar und luftdicht verschraubbar. Über diesen Weg fand die Versorgung der Tiere mit Trinkwasser und Nahrung und die regelmäßige Käfig-/Kastenreinigung statt. Weiterhin wurde die Umgebungstemperatur auf 22° eingestellt. In den Expositionskäfigen betrug die Luftfeuchtigkeit 50-60%. Die PVC-Kästen mit den Versuchstieren befanden sich in einem lichtkontrollierten Raum mit künstlichem Tag-/Nachtzyklus.

In den Kästen wurde eine künstliche Atmosphäre mit definierter Schadstoffkonzentration geschaffen. Dabei erfolgte die Zuleitung des Stickstoffdioxid-Luft-Gemisches über ein Schlauchsystem, in welchem Stickstoffdioxid aus Gasflaschen mit Druckminderer und Pressluft aus einem Wandanschluss gemischt wurden. Atmosphären mit definierten NO₂-Konzentrationen konnten dabei durch die Verdünnung eines konzentrierten Gasgemisches (NO₂-Konzentration bis 1685 ppm), das in Gasflaschen zur Verfügung stand, mit Pressluft erzeugt werden. Mit kontrollierenden Messungen wurde das Gasgemisch auf die gewünschte Konzentration von zum Beispiel 10 ppm NO₂ eingestellt. Um eine Luftdurchmischung zu ermöglichen, wurde ein Ventilator in den Kasten eingebracht. Auf der oberen Seite des Kastens befanden sich drei mit Stopfen verschlossene Öffnungen. Mit Hilfe eines Schlauchsystems konnte auf diesem Weg die NO₂-Konzentration mittels eines elektronischen Systems (ECS 102-1, Fa. MPSensor Systems GmbH, München) kontinuierlich überwacht werden.

Die nativen Tiere wurden im gleichen Tierkäfig in einem separaten Raum gehalten. Dabei wurden die Kontrolltiere unter identischen Bedingungen gegenüber Pressluft ohne Zumischung von NO₂ oder anderer Gase exponiert.

2.2.3 Durchführung der modifizierten Ussing-Kammer-Methode

2.2.3.1 Die modifizierte Ussingkammer-Technik

Die Ussingkammer wurde in den 1940er Jahren vom dänischen Physiologen Hans Ussing (1911-2000) erfunden. Die aus Plexiglas gefertigte Ussing-Kammer setzt sich aus verschiedenen Teilen zusammen, die im Inneren einen Hohlraum bilden. Die

Ussing-Kammer besteht dabei aus zwei Halbzellen, zwischen denen die Tracheal- oder Bronchialwand nach Präparation abgedichtet eingespannt wird. Die Halbzellen werden mit Nährlösung (M 199) gefüllt, um eine physiologische Umgebung für das Gewebe zu schaffen. Durch Änderung der Zusammensetzung der Perfusionslösung in der entsprechenden Halbzelle bietet die Ussing-Kammer die Möglichkeit verschiedener funktioneller Studien. Ussing führte 1947 erste Experimente an Froschhaut durch, bei denen er zwei Natriumisotope verwendete [162].

Die Ussing-Kammer fand auch für andere wissenschaftliche Fragen verschiedener Arbeitsgruppen Interesse, so dass sie in den folgenden Jahren entsprechend weiterentwickelt und modifiziert wurde [30, 32].

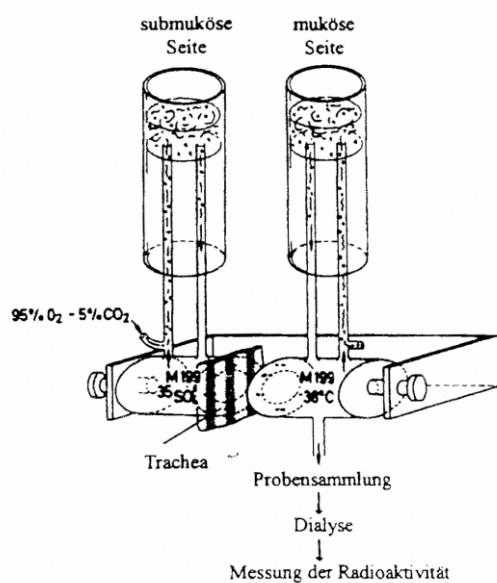


Abbildung 2.1 Schematische Darstellung der Ussing-Kammer-Technik [174]

Die modifizierte Ussing-Kammer Methode ist eine etablierte Methode, um die makromolekularen Sekretionen von Drüsen und Epithel der Tracheapräparationen zu messen. Hierbei werden die Makromoleküle mit radioaktivem Schwefel ^{35}S markiert [31].

2.2.3.2 Operation und Präparation der Trachea

Zu Versuchsbeginn wurde das Gewicht der Tiere bestimmt, um eventuelle Abweichungen in die Ergebnisauswertung einzubeziehen und den Zustand der Tiere beurteilen zu können. Die Versuchstiere wurden durch eine intraperitoneale Injektion von Pentobarbital (Narcoren[®] 70 mg/kg KG) anästhesiert. Die Tiere wurden in Rückenlage positioniert. Nach Hautinzision in der Medianlinie von Larynx bis distal des Xiphoids erfolgte die stumpfe Präparation der Trachea. Danach erfolgte die Eröffnung des Thorax durch mediane Sternotomie mit der Knopfschere. Im Anschluss daran

wurde der Thorax mit einem Rippenspreizer offengehalten. Ein Schnitt wurde oberhalb des Larynx und oberhalb der Bifurkation gesetzt, um die Trachea zu entnehmen. Die entfernte Trachea wurde sofort in ein vorbereitetes Präparationsbecken gebracht, welches mit von Carbogengas durchströmtem und gekühltem Nährmedium gefüllt war.

Die Trachea wurde, nachdem diese von anhaftenden Gewebstücken befreit wurde, im Präparationsbecken entlang des *Paries membranaceus* eröffnet und mit Nadeln auf der Silikonplatte fixiert, so dass die luminale Seite nach oben zeigte. Danach wurde die mit Nadeln besetzte Ussingkammer-Hälfte auf die Trachea gesetzt, so dass die zentrale Öffnung (18 mm²- spätere Versuchsfläche) vollständig verschlossen wurde. Diese Hälfte wurde mit der fixierten Trachea aus dem Präparationsbecken entnommen, um nun das Gegenstück der Ussingkammer aufzusetzen. Diesem Gegenstück war die Adventitiaseite der Trachea zugewandt. Die Kammer wurde nun vollständig durch die Trachea abgedichtet. Dieser Vorgang wurde für jede Trachea nacheinander durchgeführt.

2.2.3.3 Einsetzen der Ussing-Kammer in die Perfusionsapparatur

Nachdem die Ussingkammer mit Hilfe einer Schraubklemme in die Ussing-Anlage eingespannt wurde, wurde jede Kammerhälfte mit zwei oberen und einem unteren Dreivegehahn bestückt. Beide Seiten wurden sofort mit Nährmedium (siehe Lösungszusammensetzung) versorgt (jeweils 7 ml). Um ein physiologisches Milieu aufrechtzuerhalten, wurde das auf einen pH von 7,41 eingestellte Nährmedium auf 37 °C über eine externe Wasserheizung mit Umwälzpumpe temperiert und von Carbogengas durchperlt, als Motor einer ständigen Zirkulation auf beiden Kammerseiten. Zunächst wurden alle Tracheen eingespannt, und es wurde sichergestellt, dass keine der Kammern undicht war.

2.2.3.4 Prinzip des modifizierten Ussing-Kammer-Versuches

2.2.3.4.1 Aquilibrierung des Gewebes mit radioaktivem Schwefel

Wir nutzten ³⁵S als Marker der Mukusglykoproteine (Muzine), indem frisches Nährmedium für die linken Seiten der Ussing-Apparatur, also der submukösen Seite des Trachealgewebes, mit 50 µ Ci ³⁵S (Halbwertszeit 87,1 Tage), einem β-Strahler als Sulfat in wässriger Lösung, versetzt und je 7 ml eingefüllt wurde. Anschließend wurden diese radioaktiven Seiten mit Kondensatfängern bestückt, um die Verdunstung einzudämmen, so dass eine Aquilibrierung bis zum Versuchsende stattfinden konnte. Basierend auf Voruntersuchungen unserer Arbeitsgruppe, worauf in der Diskussion näher eingegangen werden soll, wurde eine 3 stündige Aquilibrierungszeit als optimale

Zeitspanne gefunden, nach welcher die mit radioaktivem Schwefel markierten Mukus-Makromoleküle im Rahmen einer „steady-state-Sekretion“ (Basalsekretion) auf der mukösen Seite sezerniert werden. Voraussetzung dabei war eine intakte epitheliale Barriere, damit der Marker nicht durch freie Diffusion auf die luminale Seite übertreten kann.

2.2.3.4.2 Abnahme der Sammlungen

Vor Beginn der regulären Sammlungen wurde die rechte Seite der Ussing-Apparatur in mehreren Durchgängen mit frischem Nährmedium gespült, um die während der Sättigungsphase angesammelten radioaktiv markierten Muzine zu entfernen. Nach dieser Zeit beobachtete man eine „steady-state-Sekretion“ radioaktiv markierter Moleküle auf der mukösen Seite [30, 31]. Ab der dritten Stunde erfolgten mindestens 4 Leersammlungen, um das Niveau der Basalsekretion festzustellen. Im Anschluss daran konnte die erstmalige Stimulation mit einer Testsubstanz, in dem eine zu testende Substanz dem Nährmedium der mukösen Seite zugegeben wurde, erfolgen. Die Sammlungen erfolgten im 15-Minuten-Takt. Dabei wurde für jede einzelne Trachea die vollständige Entleerung der rechten Kammer (Mukosaseite) in einen am Ende vorgeknoteten Dialyseschlauch vorgenommen. Anschließend wurde die entleerte Seite mit neuem Medium (7 ml) für die folgenden 15 Minuten gefüllt. Der Dialyseschlauch mit dem gesammelten Medium wurde nun durch Knoten verschlossen, mit etikettierten Tesastreifen versehen und in einen vorbereiteten Behälter mit Dialyselösung (siehe Lösungszusammensetzung) gebracht.

Bei einem Versuch wurden im Schnitt 6 bis maximal 10 Tracheen eingespannt. Die Abnahme erfolgte im Minuten-Takt, wobei für jede einzelne Trachea aber der 15-Minuten-Rhythmus eingehalten wurde.

2.2.3.4.3 Versuchsaufbau

Die ersten 5 Sammlungen (nach 15, 30, 45, 60 und 75 Minuten) wurden ohne Stimulation abgenommen, um die basale Muzinproduktion zu erfassen. Dazu wurde der Mittelwert dieser Ergebnisse bestimmt. Die Ergebnisse dienten als Vergleichswerte gegenüber der Stimulation durch verschiedene Mediatoren. Danach bestand die Möglichkeit durch einmalige, mehrmalige oder kombinierte Mediatorengabe den Einfluss auf die sekretorische Aktivität zu untersuchen. Der zu untersuchende Mediator wurde dazu vorher in 7 ml frischem Nährmedium gelöst und anstatt des reinen Nährmediums nun in die rechte, muköse Kammerseite gefüllt. Dabei war ebenfalls jede Dosis 15 min lang mit dem Gewebe in Kontakt, so dass in der nächsten Sammlung die

Auswirkung auf die Muzinproduktion gemessen werden konnte. Wurden unterschiedliche Mediatoren eingesetzt, bestand zwischen den Stimulationen ein Zeitraum von 5 Leer-Sammlungen, um die konstante Basalsekretionsrate zurückzuerlangen [31]. Zum Abschluss eines jeden Versuches wurde Acetylcholin, 70 µl einer 0,1 M wässrigen Lösung pro 7 ml Medium, appliziert. Dies entsprach einer Kammerkonzentration von 10^{-3} Mol, um eine physiologische Antwort und die erhaltene Funktionsfähigkeit des Trachealepithels sicherzustellen.

Versuchsaufbau zur Untersuchung des Einflusses der inhalativen Noxe NO₂ auf die Muzinsekretion im Speziesvergleich

Hierzu wurden Gruppen von Tieren, entweder F344-Ratten oder SD-Ratten, über einen Zeitraum von 1, 3, 20 und darüber hinaus exemplarisch von 2 und 28 Tagen gegenüber 10 ppm NO₂ exponiert. Bei jeder Organkultur eines Expositionszeitraumes, auch bei nicht exponierten Tieren, wurde die Basalsekretion aus den ersten 4 bis 5 Sammlungen bestimmt. Zum Abschluss eines jeden Versuches wurde zur Frage der maximal stimulierbaren Sekretion ACh 1 mM mukös gegeben.

Versuchsaufbau zur Untersuchung des Einflusses der peptidergen Substanz SP auf die Muzinsekretion nativer und exponierter Tiere im Speziesvergleich

Bezüglich der Erkenntnisse der Bedeutung der NANC-Regulationsmechanismen bei der Muzinsekretion und eines nachgewiesenen maximalen sekretagogen Einflusses von SP 1 µM bei nicht exponierten Tieren wurde nun die Wirkung von SP in unserem COPD-Modell untersucht.

Hierzu wurden Gruppen von Tieren, entweder F344-Ratten oder SD-Ratten, über einen Zeitraum von 1 (nur F344-Ratten), 3 und 20 Tagen gegenüber 10 ppm NO₂ exponiert.

Bei jeder Organkultur eines Expositionszeitraumes, auch bei nicht exponierten Kontrolltieren, wurde die Basalsekretion aus denjenigen Sammlungen (3 bis 5) bestimmt, die einer Substanzgabe unmittelbar vorausgingen. Zur Frage der sekretagogen Effekte von SP wurde 1 µM auf der mukösen Seite frühestens zum Zeitpunkt von 90 Minuten gegeben. Falls eine Vorsubstanz getestet wurde, erfolgte die Applikation von SP frühestens nach 75 min, um eine Erholung des Organsystems zu gewährleisten. Als Abschluss der jeweiligen Versuche wurde ACh 1mM zur Kontrolle des Systems gegeben.

In getrennten Versuchen wurde die Wirkung von SP bei den SD-Ratten mit gleichem Versuchsaufbau getestet.

Versuchsaufbau zur Untersuchung der Wirkung von GM-CSF nativ und nach NO₂-Exposition im Speziesvergleich

Hierzu wurden Gruppen von F344-Ratten über einen Zeitraum von 1, 3 und 20 Tagen gegenüber 10 ppm NO₂ exponiert. Zusätzlich wurden Gruppen von nicht-exponierten Kontrolltieren eingesetzt. Zuerst erfolgten fünf Messungen nach 15, 30, 45, 60 und 75 Minuten ohne Stimulation der Schleimsekretion. Der Mittelwert aus diesen Messungen wurde als Basalsekretion angesehen. Danach wurde frühestens zum Zeitpunkt von 90 Minuten je Versuchsreihe, GM-CSF in einer Konzentration von 0,01 ng/ml; 0,05 ng/ml; 0,1 ng/ml; 0,15 ng/ml; 0,2 ng/ml; 0,4 ng/ml und 1,0 ng/ml auf der Mukosaseite appliziert, um nach einer Dosis-Wirkungs-Beziehung zu suchen. Falls eine Vorsubstanz getestet wurde, erfolgte die Applikation von GM-CSF frühestens nach 75 Minuten. Zum Schluss der Versuchsreihe wurde wieder mit Acetylcholin in 10⁻³ molarer Lösung stimuliert.

Versuchsaufbau zur Untersuchung der Muzinsekretion mit der Frage nach einer interaktiven Wirkung zwischen dem Tachykinin SP und dem Zytokin GM-CSF

Beide Substanzen repräsentieren Entzündungsmediatoren, welche wesentliche Faktoren beim Aspekt der inflammatorisch induzierten Hypersekretion darstellen dürften. Bislang ist wenig über interaktive Mechanismen bekannt.

Bei jeder Organkultur der F344-Ratten wurde die Basalsekretion aus den 3 bis 4 vorgeschalteten Sammlungen vor Stimulation bestimmt. Zur Minute 90 wurde zuvor mukös appliziertes SP (1µM), zur Minute 165 zuvor mukös appliziertes GM-CSF (0,2 ng/ml) und zur Minute 255 zuvor mukös appliziertes SP + GM-CSF durch Sammlung entfernt. Zum Schluss der Versuchsreihe wurde bei Minute 315 mit Acetylcholin (10⁻³ mol/l (1mM)) stimuliert.

2.2.3.4.4 Aufbereitung der Proben

Standards

Standardproben dienten dem Aktivitätsvergleich zwischen Anfang und Ende eines Versuches.

Zu Beginn und zum Ende der Probensammlungen wurden von der submukösen Seite der Ussing-Kammer je 20 µl entnommen und mit 10 ml Szintillatorlösung sowie 7 ml Aqua dest. versetzt. Beide Aktivitäten wurden miteinander verglichen. Drastische Differenzen zwischen erstem und zweitem Standard hätten auf ein Leck im Gewebestück hingewiesen. Wenn wie hier beschrieben radioaktives Nährmedium auf

die Seite der Probenabnahme durch Leckage gelangte, wurden die Ergebnisse dieser Trachea verworfen.

Dialysevorgang

Die Proben wurden sofort nach Abnahme in ein dafür vorbereitetes Gefäß mit Dialyseflüssigkeit eingebracht. Das Dialysat setzte sich aus Aqua dest., 12 g Na_2SO_4 und einer Spitze Natriumazid zusammen. Letzteres diente dazu, um bei dem proteinhaltigen Medium einer bakteriellen Besiedelung entgegenzuwirken. Natriumsulfat dagegen verdrängt nicht kovalent gebundenen Schwefel. Kleinere Moleküle und ungebundenes ^{35}S , das nicht im Mukus eingebaut wurde, konnte über diese Methode durch die Poren der Dialyseschläuche eliminiert werden, welche für Moleküle kleiner als 14.000 Da permeabel waren.

Das Dialysewasser wurde acht mal mit einem Mindestabstand von drei Stunden erneuert. Die Dialyse konnte als beendet betrachtet werden, wenn die Count-Rate diejenige von Leitungswasser, ca. 30 „counts per minute“ (cpm), erreicht hatte.

2.2.3.4.5 Probenauswertung

Der Inhalt der Dialyseschläuche (jede Probe 7 ml) wurde in 20 ml Zählflaschen entleert und mit je 10 ml Szintillationslösung vermischt. Danach wurden die Proben so sortiert, dass alle Sammlungen von einer Trachea nacheinander gemessen wurden. Außerdem wurden drei Wasserproben (7 ml) des letzten Dialysewassers entnommen und ebenfalls mit 10 ml Szintillationslösung versetzt. Aus diesen Werten ergab sich später der Backgroundmittelwert (ermittelte Zählrate), welcher in der Auswertung von den einzelnen Proben, also von der Zählrate der einzelnen Proben, subtrahiert wurde. Der „Background-Wert“ betrug annähernd 30 cpm als Aktivitätsniveau des Leitungswassers. So ergab sich ein Maß für die Sekretion von ^{35}S -markierten Makromolekülen. Der β -Counter zählte die Proben in cpm als Maß der Muzinsekretion.

2.3 Auswertungen der Daten und statistische Methoden

Für einen zu untersuchenden Stimulus waren mindestens 7 Ergebnisse unterschiedlicher Versuchstiere für die Auswertung notwendig, zumal jedes Versuchstier einer Spezies ein gering individuell abweichendes Sekretionsniveau aufweist. Vereinzelt waren für die Bewertung nur geringere Fallzahlen verfügbar, da auch zu exemplarischen Zwecken Untersuchungen erfolgten.

Die vorangegangene unstimulierte Sekretion von mindestens 3 Sammlungen wurde als Basalwert definiert. Die Änderung der Sekretion nach Stimulation wurde darauf

bezogen und entweder in Gegenüberstellung der Absolutwerte (cpm) oder in Prozent der Basalsekretion ausgedrückt.

Die Werte wurden gemittelt und die Standardabweichung berechnet.

Statistische Methoden [147a, 144b]

Die deskriptive Darstellung der metrisch skalierten Parameter erfolgt tabellarisch mit der Darstellung des arithmetischen Mittelwertes, der Standardabweichung und eines Konfidenzintervalls für den Mittelwert. Als weitere Lage- und Streuungsmaße sind der Median (50%-Quartil) und der Interquartilbereich, d.h. das Intervall des 25% und 75% Quartil, angegeben. Der Median wurde für die statistische Aufbereitung der Daten zugrunde gelegt.

Die Daten wurden mit Normal Q-Q Plots und dem Shapiro-Wilk-Test auf Normalverteilung überprüft. Die Überprüfung ergab in der Regel einen Widerspruch zur Hypothese der Normalverteilungsannahme.

Somit wurden Vergleiche zwischen zwei unabhängigen Gruppen mit dem nichtparametrischen Mann-Whitney U-Test durchgeführt. Vergleiche zwischen mehr als zwei unabhängigen Versuchsgruppen wurden mit dem nichtparametrischen Kruskal-Wallis-Test und anschließenden multiplen paarweisen Vergleichen (Dunn-Bonferroni-Tests) durchgeführt [91b].

Für zwei Vergleiche innerhalb einer Versuchsgruppe wurde der nichtparametrischen Wilcoxon-Test verwendet [152a]. Bei mehr als zwei Vergleichen innerhalb einer Versuchsgruppe (Kombinationsversuchen) wurde der Friedman-Test [63a] angewandt. Die Signifikanzniveaus wurden nach Bonferroni-Holm korrigiert.

Die graphische Darstellung der Ergebnisse erfolgt durch Boxplots.

Das Alpha-Niveau der Studie liegt bei $p=0.05$. Die Auswertung erfolgte mit dem Programm R für Windows Version 3.01.

Die Tests wurden zusammen mit Herrn Mogk, MoReData GmbH, durchgeführt.

3 Ergebnisse

3.1 Hintergrund

Mukushypersekretion und Hyperplasie des Drüsenapparates sind Charakteristika entzündlicher Atemwegserkrankungen wie der COPD.

Die Muzinsekretion wurde an Trachealexplantaten zwei verschiedener Rattenstämme mit der modifizierten Ussing-Kammer untersucht. Hierbei erfolgte eine radioaktive Markierung der Muzinmoleküle mit ^{35}S zur Quantifizierung der Sekretion trachealer submuköser Drüsen. Die Versuchsdurchführungen stellen eine Anlehnung an Vorversuche hinsichtlich des eingesetzten Tracers ^{35}S , der Äquilibrationszeit, des Sekretionsprofils, des Dialysevorganges und der eingesetzten NO_2 -Konzentration dar. Die methodischen Vorgehensweisen der modifizierten Ussing-Kammer-Methode und Versuchsdurchführungen werden im Kapitel Material und Methoden beschrieben und im Kapitel 4 hinsichtlich ihrer Validität diskutiert.

Die folgenden Ergebnisse basieren auf der Konzeption eines schematisierten zeitlichen Ablaufs. Zwei verschiedene Spezies, F344-Ratten und männliche SD-Ratten, wurden kontinuierlich über 1, 3 und 20 Tage und darüber hinaus auch exemplarisch über 2 und 28 Tage einer artifiziellen Atmosphäre mit 10 ppm Stickstoffdioxid ausgesetzt. Kontrolltiere wurden gegenüber einer Atmosphäre aus Pressluft unter Umgebungsdruckbedingungen ohne Zumischung von NO_2 exponiert (Scheinexposition).

Wir untersuchten die tracheobronchiale Muzinsekretion der Trachea nativer und NO_2 exponierter Ratten, zum einen bei Fischerratten und im Speziesvergleich zusätzlich auch bei SD-Ratten. Dabei wurden die Basalsekretion, die ACh-stimulierte Sekretion sowie die Einflüsse verschiedener Mediatoren (GM-CSF, SP) erfasst.

Nach Zugabe von ^{35}S zur submukösen Kammerseite erfolgte eine Markierung (Äquilibrationszeit) der sulfatierten Makromoleküle. Danach erfolgte die erste Probenentnahme frühestens zwei Stunden nach ^{35}S -Applikation im jeweiligen Abstand von 15 Minuten, um eine konstante Sekretionsrate, die Basalsekretion, zu gewährleisten. Nach mehr als drei Stunden wurde je nach Versuchsaufbau die erste Testsubstanz appliziert. Weitere Stimulationen erfolgten in einem Abstand von mindestens 30 Minuten, um eine Regenerationsfähigkeit der Organkultur zu gewährleisten und Wirkungsminderungen oder Wechselwirkungen zu minimieren. Zum Abschluss eines jeden Versuches wurde Acetylcholin in einer Konzentration von

10^{-3} Mol appliziert, um die erhaltene Funktionsfähigkeit des sekretorischen Apparates an nativen wie auch NO_2 -exponierten Tieren nachzuweisen.

Nach Probensammlung erfolgte die Aufbereitung der Proben durch die Dialyse, um die ^{35}S -Markierten Glycokonjugate von freiem oder ionisch gebundenem ^{35}S zu trennen. Die Dialyse wurde nach Erreichen einer Aktivität von ca. 30 cpm, Leitungswasser entsprechend, im Dialysat beendet. Die Radioaktivität der einzelnen Proben wurde anschließend im β -Zähler analysiert.

Entsprechend der beschriebenen Versuchsdurchführung erhält man bei Anwendung der Ussing-Kammer Technik ein Sekretionsprofil der Trachea über einen bestimmten Zeitraum. Jeder Messwert stellt dabei die Sekretion während einer Zeitspanne von 15 Minuten dar. Veränderungen der Sekretion in Bezug zu einer konstanten basalen Sekretionsrate drücken eine negative oder positive Veränderung der Sekretion nach einem Stimulus aus. Um einzelne Tracheen, welche jeweilig ein eigenes Sekretionsniveau zeigen, zu vergleichen und in Bezug setzen zu können, lässt sich die stimulationsbedingte Sekretionsänderung in Bezug auf die vorausgehenden Leersammlungen durch eine prozentuale Angabe darstellen (=Prozent der Basalsekretion). Die Basalsekretion ist definiert als Zählrate von mindestens drei Leersammlungen vor Stimulation und wird als 100% gesetzt.

Die im Folgenden verwendeten Boxplots dienen der übersichtlichen Darstellung der Verteilung der absoluten und relativen Zählraten von ^{35}S -markierten Makromolekülen in counts per minute (cpm). Der abgesetzte mittlere Strich der Box entspricht dem Median der basalen und stimulierten Muzinsekretion der getesteten Tracheen. Die Box wird durch das obere 0,75-Quartil und untere 0,25-Quartil begrenzt und stellt somit den Bereich dar, in dem sich 50% der Daten befinden. Die Länge der Box entspricht dem Interquartilsabstand und dient als Maß der Streuung der Daten.

Die beiden gestrichelten senkrechten Striche ober- und unterhalb der Box stellen die größten bzw. kleinsten Werte, die keine Ausreißer sind, dar. Eine detaillierte Beschreibung und Definition der Darstellung von Daten mit Boxplots findet sich im Anhang.

3.2 Speziesvergleich der Basalsekretion und ACh-stimulierten Muzinsekretion nativ und nach Einfluss der inhalativen Noxe NO_2

Die Menge des radioaktiv markierten Schleims wird im Folgenden mit absoluten Werten der Zählraten in cpm angegeben, dabei wurde für die statistische Auswertung und die graphische Darstellung der Median herangezogen. Die Basalsekretion entspricht der nativen Sekretionsleistung der submukösen Drüsen. Acetylcholinchlorid (ACh) entspricht dabei einer Hinzugabe einer Menge von 1 mM. Die durch ACh

auslösbare Sekretion ist ein cholinerg starker Sekretionsreiz und gilt als Maßstab für die maximale Sekretionsantwort der Trachea. Expositions- sowie stimulationsabhängige Änderungen der Sekretion werden im Folgenden demonstriert.

3.2.1 Basale und ACh-stimulierte Muzinsekretion der F344-Ratten-Trachea nativ und nach Kurz- und Langzeitexposition gegenüber 10 ppm NO₂

Tabelle 3.1 bis 3.4 sowie Abb. 3.1 zeigen die basale und die ACh-stimulierte sekretorische Aktivität der untersuchten Fischerrattentracheen nach 1 (n=37)-, 3 (n=41)- und 20 (n=53)-tägiger Exposition gegenüber 10 ppm NO₂ im Vergleich zu Kontrolltieren (n=56).

Tabelle 3.1 Basale und ACh-stimulierte Muzinsekretion der nativen Fischerrattentrachea in vitro

	n	Mean	SD	CI	MEDIAN	Range
MW Basal cpm	56	50.01	33.08	[41.15 ; 58.87]	45.82	[22.97 ; 63.57]
SD Basal cpm	56	25.95	32.03	[17.37 ; 34.53]	16.02	[7.83 ; 25.73]
Median Basal cpm	56	43.13	27.71	[35.71 ; 50.55]	36.92	[21.59 ; 52.69]
ACh 1mM	56	101.75	91.8	[77.16 ; 126.33]	71.34	[49.68 ; 115.87]
Diff. in cpm	56	51.73	77.75	[30.91 ; 72.55]	32.78	[3.5 ; 76.41]
% of basal	56	236.8	274.59	[163.26 ; 310.33]	182.85	[119.32 ; 272.65]

Tabelle 3.2 Basale und ACh-stimulierte Muzinsekretion der Fischerrattentrachea in vitro nach 1-tägiger Exposition gegenüber 10 ppm NO₂

	n	Mean	SD	CI	MEDIAN	Range
MW Basal cpm	37	59.58	65.72	[37.67 ; 81.49]	48.34	[33.54 ; 63.82]
SD Basal cpm	37	36.73	76.49	[11.23 ; 62.23]	21.46	[13.97 ; 27.68]
Median Basal cpm	37	48.27	37.58	[35.74 ; 60.08]	43.09	[27.17 ; 54.33]
ACh 1mM	37	108.34	75.46	[83.18 ; 133.5]	91.89	[56.5 ; 144.04]
Diff. in cpm	37	48.76	64.99	[27.09 ; 70.43]	29.54	[16.52 ; 73.23]
% of basal	37	219.57	140.62	[172.69 ; 266.4]	185.57	[136.94 ; 266.47]

Tabelle 3.3 Basale und ACh-stimulierte Muzinsekretion der Fischerrattentrachea in vitro nach 3-tägiger Exposition gegenüber 10 ppm NO₂

	n	Mean	SD	CI	MEDIAN	Range
MW Basal cpm	41	51.68	23.38	[44.31 ; 59.06]	48.29	[38.35 ; 62.88]
SD Basal cpm	41	22.88	20.88	[15.92 ; 29.1]	13.75	[9.97 ; 27.51]
Median Basal cpm	41	45.28	18.05	[39.85 ; 50.97]	41.75	[36.94 ; 55.67]
ACh 1mM	41	160.76	136.35	[117.72 ; 203.8]	125.59	[64.21 ; 205.74]
Diff. in cpm	41	109.08	127.65	[68.78 ; 149.37]	59.58	[30.46 ; 135.6]
% of basal	41	320.8	210.17	[254.46 ; 387.13]	255.35	[168.05 ; 412.88]

Tabelle 3.4 Basale und ACh-stimulierte Muzinsekretion der Fischerrattentrachea in vitro nach 20-tägiger Exposition gegenüber 10 ppm NO₂

	n	Mean	SD	CI	MEDIAN	Range
MW Basal cpm	53	72.29	97.46	[45.42 ; 99.15]	50.13	[34.52 ; 74.09]
SD Basal cpm	53	64.91	240.02	[-1.25 ; 131.06]	17.03	[11.29 ; 29.29]
Median Basal cpm	53	49.83	31.07	[41.26 ; 58.39]	43.26	[26.83 ; 67.24]
ACh 1mM	53	173.94	185.13	[122.91; 224.97]	134.48	[86.52 ; 198.2]
Diff. in cpm	53	101.65	200.43	[46.4 ; 156.9]	79.48	[30.68 ; 126.12]
% of basal	53	312.62	238.78	[246.81; 378.44]	268.12	[180.61 ; 348.2]

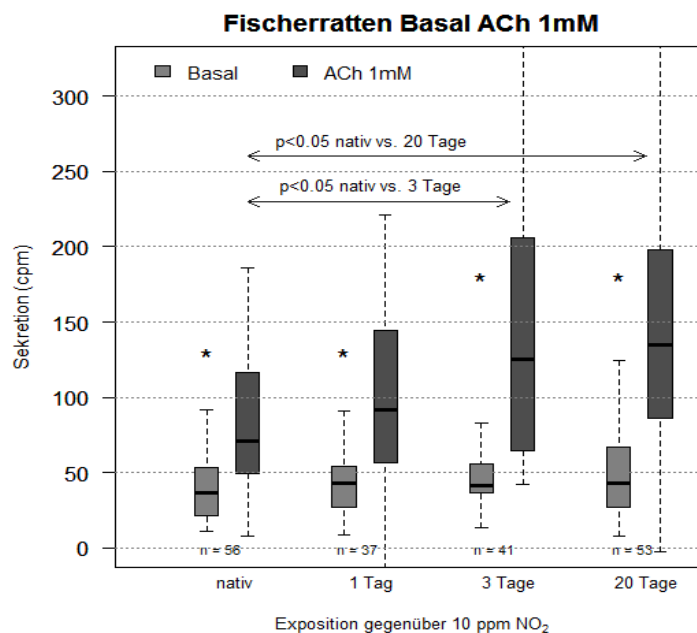


Abbildung 3.1 Basale und ACh-stimulierte Muzinsekretion der Fischerrattentrachea in vitro nach 1-, 3- und 20-tägiger Exposition gegenüber 10 ppm NO₂ im Vergleich zu Kontrolltieren

Im Ergebnis zeigen sich sowohl bei den Kontrolltieren als auch bei den in unterschiedlicher Dauer gegenüber 10 ppm NO₂ exponierten Fischerratten signifikant höhere Sekretionsraten unter ACh-Stimulation (*= $p < 0,01$; Wilcoxon-Test). Der Wilcoxon-Test untersucht den Unterschied innerhalb einer Rattenart bei fixem Zeitpunkt und vergleicht Median Basal versus ACh-Stimulation.

Es zeigt sich keine signifikante ($p = 0,577$; Kruskal-Wallis-Test) Änderung der basalen Sekretionsrate im direkten Vergleich der Kontroll-, 1-Tages-, 3-Tages- und 20-Tages-Expositionsgruppe. Der Kruskal-Wallis-Test untersucht Unterschiede innerhalb einer Rattenart in Abhängigkeit der Länge der Exposition.

Im Vergleich zwischen Kontrolltieren zu 3-Tages- und Kontrolltieren zu 20-Tages-exponierten Tieren zeigt sich bezüglich der ACh-Stimulation ein signifikanter Unterschied ($\leftrightarrow p = 0,001$; Kruskal-Wallis-Test). Der Kruskal-Wallis-Test untersucht Unterschiede in der Sekretionsantwort nach ACh-Stimulation innerhalb einer Rattenart

in Abhängigkeit der Länge der Exposition. Da signifikante Unterschiede vorliegen erfolgt anschließend hier der paarweise Vergleich zwischen den Zeitdauern.

Zusammenfassend zeigt sich sowohl bei den Kontrolltieren als auch bei den jeweiligen Expositionszeiten eine Signifikanz nach ACh-Stimulation.

Bezüglich der Basalsekretion findet sich bei der F344-Ratten-Trachea keine signifikante Änderung der sekretorischen Aktivität innerhalb aller Expositionszeiten, sowohl im Vergleich untereinander, als auch im Vergleich zu den Kontrolltieren.

Die ACh-stimulierte Muzinsekretion der F344-Ratten-Trachea zeigt in Tabelle 3.1 bis 3.4 und Abbildung 3.1 in Abhängigkeit von der NO₂-Exposition eine erhöhte Sekretionsrate mit signifikanten Werten bei 3 Tagesexposition und 20 Tagesexposition im Vergleich zu den Kontrolltieren. Die Untersuchungen demonstrieren somit eine NO₂-expositionszeitabhängige Stimulierbarkeit der Mukussekretion durch ACh. Bei langzeitexponierten Tracheen steigt somit die sekretomodulatorische Wirkung von ACh nach 3 tägiger Exposition auf 125,59 cpm (nativ: 71,34 cpm) und in der längsten hier untersuchten Zeit von 20 Tagen auf 134,48 cpm (nativ: 71,34 cpm).

3.2.2 Basale und ACh-stimulierte Muzinsekretion der SD-Ratten-Trachea nativ und nach Kurz- und Langzeitexposition gegenüber 10 ppm NO₂

Tabelle 3.5 bis 3.10 sowie Abb. 3.2 zeigen die basale und die ACh-stimulierte sekretorische Aktivität der untersuchten SD-Rattentracheae nach 1 (n=4)-, 2 (n=4)-, 3 (n=9)-, 20 (n=6)-, und 28 (n=6)-tägiger Exposition gegenüber 10 ppm NO₂ im Vergleich zu Kontrolltieren (n=50).

Tabelle 3.5 Basale und ACh-stimulierte Muzinsekretion der nativen SD-Ratten-Trachea in vitro

	n	Mean	SD	CI	MEDIAN	Range
MW Basal cpm	50	129.71	113.79	[97.37 ; 162.05]	81.35	[52.35 ; 189.01]
SD Basal cpm	50	35.5	32.57	[26.25 ; 44.76]	24.47	[12.31 ; 52.62]
Median Basal cpm	50	131.57	118	[98.04 ; 165.11]	75.92	[52.95 ; 182.65]
ACh 1mM	50	583.83	425.51	[443.97; 723.69]	481.97	[264.1 ; 804.37]
Diff. in cpm	50	314	366.96	[209.71; 418.29]	225.23	[11.04 ; 466.5]
% of basal	50	374.49	418.28	[255.61; 493.36]	299.9	[122.1 ; 466.92]

Tabelle 3.6 Basale und ACh-stimulierte Muzinsekretion der SD-Ratten-Trachea in vitro nach 1-tägiger Exposition gegenüber 10 ppm NO₂

	n	Mean	SD	CI	MEDIAN	Range
MW Basal cpm	4	160.87	100.08	[1.63 ; 320.12]	158.41	[100.61; 218.68]
SD Basal cpm	4	53.14	21.01	[19.71 ; 86.57]	51.94	[35.15 ; 69.92]
Median Basal cpm	4	148.06	103.02	[-15.86 ; 311.99]	145.8	[84.25 ; 209.6]
ACh 1mM	4	445.39	160.21	[190.46 ; 700.3]	478.6	[369.76; 554.23]
Diff. in cpm	4	284.52	86.5	[146.89 ; 422.1]	279.9	[243.12 ; 321.3]
% of basal	4	333.02	122.54	[138.04 ; 528]	324.74	[272.15; 385.61]

Tabelle 3.7 Basale und ACh-stimulierte Muzinsekretion der SD-Ratten-Trachea in vitro nach 2-tägiger Exposition gegenüber 10 ppm NO₂

	n	Mean	SD	CI	MEDIAN	Range
MW Basal cpm	4	129.38	57.18	[38.4 ; 220.36]	120.29	[100.36; 149.31]
SD Basal cpm	4	43.4	24.4	[4.57 ; 82.24]	44.28	[24.49 ; 63.2]
Median Basal cpm	4	124.55	49.03	[46.54 ; 202.56]	113.61	[104.51; 133.64]
ACh 1mM	4	620.88	243.71	[233.07 ; 1008]	609.94	[424.27; 806.09]
Diff. in cpm	4	491.5	195.15	[180.97 ; 802.0]	489.65	[324.37; 656.78]
% of basal	4	493.45	99,7	[334.8 ; 652.09]	488.33	[416.28; 565.51]

Tabelle 3.8 Basale und ACh-stimulierte Muzinsekretion der SD-Ratten-Trachea in vitro nach 3-tägiger Exposition gegenüber 10 ppm NO₂

	n	Mean	SD	CI	MEDIAN	Range
MW Basal cpm	9	124.65	65.4	[74.38 ; 174.92]	117.35	[89.87 ; 148.98]
SD Basal cpm	9	40.66	21.13	[24.42 ; 56.91]	40.17	[20.9 ; 59.09]
Median Basal cpm	9	117.2	67.63	[65.22 ; 169.18]	124.08	[78.22 ; 141.36]
ACh 1mM	9	350.56	250.9	[157.7 ; 543.42]	266.62	[197.2 ; 385.69]
Diff. in cpm	9	225.91	240.23	[41.25 ; 410.57]	129.72	[93.36 ; 149.27]
% of basal	9	306.66	193	[158.31; 455.02]	227.2	[154.36; 392.58]

Tabelle 3.9 Basale und ACh-stimulierte Muzinsekretion der SD-Ratten-Trachea in vitro nach 20-tägiger Exposition gegenüber 10 ppm NO₂

	n	Mean	SD	CI	MEDIAN	Range
MW Basal cpm	6	149.41	47.24	[99.83 ; 198.98]	142.95	[130.44; 157.72]
SD Basal cpm	6	50.05	45.57	[2.23 ; 97.86]	33.36	[29.69 ; 36]
Median Basal cpm	6	144.62	33.13	[109.85; 179.39]	154.27	[134.02; 169.24]
ACh 1mM	6	298.99	84.82	[209.97; 388.01]	331.1	[263.94; 356.01]
Diff. in cpm	6	149.58	68.71	[77.48 ; 221.69]	153.98	[98.57 ; 191.39]
% of basal	6	205.2	53.67	[148.87; 261.53]	197.35	[159.62; 235.69]

Tabelle 3.10 Basale und ACh-stimulierte Muzinsekretion der SD-Ratten-Trachea in vitro nach 28-tägiger Exposition gegenüber 10 ppm NO₂

	n	Mean	SD	CI	MEDIAN	Range
MW Basal cpm	6	51.85	59.83	[-10.94 ; 114.64]	36.47	[5.53 ; 76.45]
SD Basal cpm	6	24.8	19.91	[3,9 ; 45.7]	23.57	[10.25 ; 28.08]
Median Basal cpm	6	53.07	67.59	[-17.86 ; 124]	30.1	[4.57 ; 72.6]
ACh 1mM	6	107.82	107.76	[-5.27 ; 220.92]	109.33	[16.77 ; 177.37]
Diff. in cpm	6	55.98	70.59	[-18.11 ; 130.06]	39.89	[1.76 ; 94.29]
% of basal	6	573.79	723.74	[-185.73;1333.3]	176.01	[127.54; 838.36]

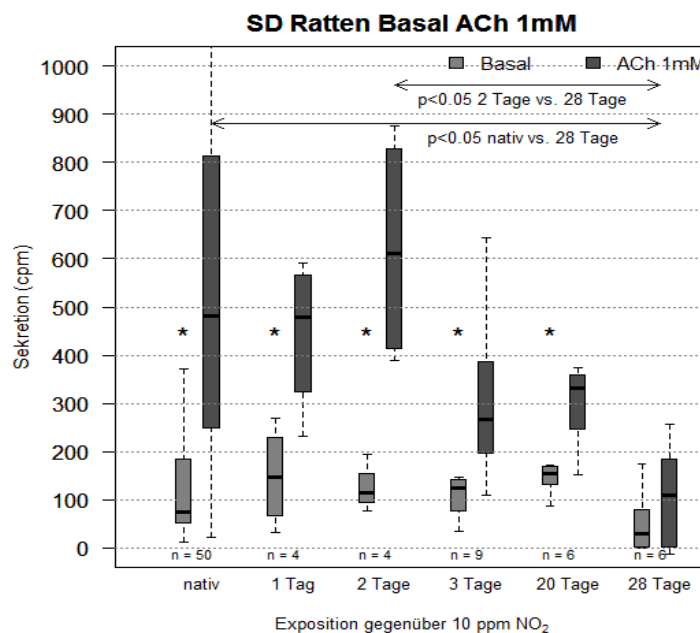


Abbildung 3.2 Basale und ACh-stimulierte Muzinsekretion der SD-Ratten-Trachea in vitro nach 1-, 2-, 3-, 20- und 28- tägiger Exposition gegenüber 10 ppm NO₂ im Vergleich zu Kontrolltieren

Im Ergebnis zeigen sich signifikant höhere Sekretionsraten (Wilcoxon-Test) nach ACh-Stimulation bei den Kontrolltieren (*= $p < 0,01$) sowie bei 1-Tages (*= $p = 0,046$)-, 2-Tages (*= $p = 0,046$)-, 3-Tages (*= $p < 0,01$)- und 20-Tages (*= $p = 0,028$)- exponierten SD-Ratten gegenüber 10 ppm NO₂. Bei 28 Tages-Exposition wird keine Signifikanz erreicht ($p = 0,173$). Zu beachten sind die in dieser Subgruppe relativ geringen Fallzahlen. Der Wilcoxon-Test untersucht den Unterschied innerhalb einer Rattenart bei fixem Zeitpunkt und vergleicht Median Basal versus ACh-Stimulation.

Es zeigt sich keine signifikante ($p = 0,192$; Kruskal-Wallis-Test) Änderung der basalen Sekretionsrate im direkten Vergleich der Kontroll-, 1-Tages-, 2-Tages-, 3-Tages-, 20-Tages- und 28-Tages-Expositionsgruppe. Der Kruskal-Wallis-Test untersucht Unterschiede innerhalb einer Rattenart in Abhängigkeit der Länge der Exposition.

Im Vergleich zwischen Kontrolltieren gegenüber 28-Tages- und 2-Tages- gegenüber 28-Tages-exponierten Tieren zeigt sich bezüglich der ACh-Gabe ein signifikanter

Unterschied ($\leftarrow \rightarrow = p = 0,005$; Kruskal-Wallis-Test) mit rückläufigen Messwerten. Der Kruskal-Wallis-Test untersucht Unterschiede in der Sekretionsantwort nach ACh-Stimulation innerhalb einer Rattenart in Abhängigkeit der Länge der Exposition. Da signifikante Unterschiede vorliegen erfolgt anschließend hier der paarweise Vergleich zwischen den Zeitdauern.

Zusammenfassend zeigen sich sowohl bei den Kontrolltieren als auch bei 1-Tages-, 2-Tages-, 3-Tages- und 20-Tages-Exposition gegenüber NO_2 signifikante Werte nach ACh-Stimulation. In der 28-Tages-Expositionsgruppe wird keine Signifikanz erreicht. Die geringen Fallzahlen von jeweils 4 Tieren in der 1- und 2-Tages-Expositionsgruppe und von jeweils 6 Tieren in der 20- und 28-Tages-Gruppe müssen jedoch berücksichtigt werden.

Bezüglich der Basalsekretion findet sich bei der SD-Ratten-Trachea keine signifikante Änderung der sekretorischen Aktivität innerhalb aller Expositionszeiten, sowohl im Vergleich untereinander, als auch im Vergleich zu den Kontrolltieren. Nach 28 Expositionstagen zeigt sich auch hier ein Verlust der sekretorischen Kapazität.

Die ACh-stimulierte Muzinsekretion der SD-Ratten-Trachea zeigt in Tabelle 3.5 bis 3.10 und Abbildung 3.2 in Abhängigkeit von der NO_2 -Exposition eine Änderung der Sekretionsrate mit signifikanten Werten zwischen der 28-Tagesexposition im Vergleich zu den Kontrolltieren und zwischen der 28-Tagesexposition im Vergleich zur 2-Tagesexposition. Die Untersuchungen demonstrieren somit einen NO_2 -expositionszeitabhängigen Verlust der Stimulierbarkeit der Mukussekretion durch ACh. Bei langzeitexponierten Tracheen der SD-Ratte nimmt die sekretomodulatorische Wirkung von ACh ab. In der längsten hier untersuchten Zeit von 28 Tagen ist ein deutlicher Sekretionsabfall auf 109,33 cpm (nativ: 481,97 cpm; Maximalwert bei 2d: 609,94) unter das Niveau der Kontrolltiere zu verzeichnen.

3.2.3 Basale Muzinsekretion nativ und nach Kurz- und Langzeitexposition gegenüber 10 ppm NO_2 im Speziesvergleich

Weiterhin wurden Vergleiche vorgenommen, um einen Überblick zu erhalten, ob entsprechende NO_2 -Dosen auch bei jeder untersuchten Spezies mit einer vergleichbaren Antwort der schleimproduzierenden Zellen einhergeht.

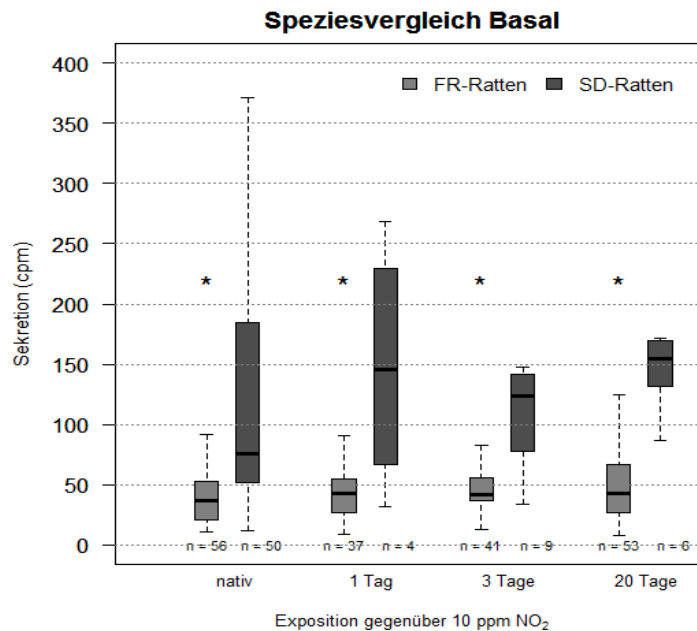


Abbildung 3.3 Basalsekretion der Fischer- und SD-Ratten-Trachea *in vitro* nach 1-, 3-, und 20-Tages-Exposition gegenüber 10 ppm NO₂ im Vergleich zu Kontrolltieren

Hier wurden Vergleiche zwischen zwei unabhängigen Gruppen mit dem nichtparametrischen Mann-Whitney U-Test durchgeführt. Somit können Unterschiede (Median Basal in cpm) zwischen den zwei Rattenarten, den Fischerratten und den SD-Ratten, zu einem fixen Zeitpunkt untersucht werden.

Es zeigen sich im Vergleich zu den Fischerratten signifikant höhere Sekretionsraten sowohl bei den Kontrolltieren (*= $p < 0,01$), als auch bei 1-Tages (*= $p = 0,043$), 3-Tages (*= $p = 0,002$) und 20-Tages (*= $p < 0,001$) exponierten SD-Ratten gegenüber 10 ppm NO₂.

Vergleicht man somit die Sekretion der Organkulturen von Fischer- und SD-Ratten, ergeben die Basalsekretionsauswertungen eine signifikant erhöhte sekretagoge Potenz der SD-Ratten im Vergleich zu den Fischerratten.

Wie schon entsprechend bei jeder untersuchten Spezies in Abbildung 3.1 und 3.2 dargestellt zeigen sich nach Durchführung des Kruskal-Wallis-Testes keine signifikanten Änderungen der basalen Sekretionsraten im Vergleich der Expositionsgruppen und Kontrolltieren. Es zeigen sich allerdings gleichsinnige Tendenzen ohne Signifikanz im Sekretionsverlauf. Nach kurzem, nicht signifikanten Anstieg der Sekretion bei 1 Tages Exposition (Fischerratte nativ/ 1d: 36,92 cpm/ 43,09 cpm; SD-Ratte nativ/ 1d: 75,92 cpm/ 145,8 cpm), lässt sich ein tendenzieller Sekretionsabfall bei 3 Tagen (Fischerratte: 41,75 cpm; SD-Ratte: 124,08 cpm) und ein Sekretionsmaximum, ebenfalls nicht signifikant, bei 20 Tagen (Fischerratte: 43,26 cpm; SD-Ratte: 154,27 cpm) verzeichnen.

3.2.4 ACh-stimulierte Muzinsekretion nativ und nach Kurz- und Langzeitexposition gegenüber 10 ppm NO₂ im Speziesvergleich

Wie in Abbildung 3.1 und 3.2 demonstriert, bewirkte Acetylcholin in einer applizierten Kammerkonzentration von 1mM bei beiden untersuchten Spezies sowohl nativ als auch nach NO₂-Exposition einen signifikanten Anstieg der Sekretionsrate, mit Ausnahme der 28-Tages-Expositionsgruppe der SD-Ratte.

In Analogie zu den Basalsekretionsauswertungen erkennt man im Speziesvergleich eine unterschiedliche sekretorische Kapazität der muzinproduzierenden epithelialen Komponenten zugunsten der SD-Spezies.

Bei den Fischerratten steigen die Absolut- und Relativwerte der Mukussekretion unter ACh-Stimulation in Abhängigkeit von der Expositionszeit an (nativ: 71,34 cpm, 182,85 %; 1 Tag NO₂: 91,89 cpm, 185,57%; 3 Tage NO₂: 125,59 cpm, 255,35%; 20 Tage NO₂: 134,48 cpm, 268,12%). Nach 3 Tagen sowie 20 Tagen NO₂-Exposition ergeben sich jeweilig signifikante expositionverstärkende Effekte gegenüber der Nativ-Gruppe. Ein unter Basalsekretion registrierter Abfall der Sekretion in der 3 Tages-Gruppe zeigt keine Parallele unter ACh-Stimulation.

Bei den SD-Ratten gibt es bei 2 tägiger Exposition einen Anstieg (609,94 cpm, 488,33%), wohingegen sich bei 3- (266,62 cpm, 227,2%), 20- (331,1 cpm, 197,35%) und 28-tägiger Exposition (109,33 cpm, 176,01%) wieder eine rückläufige Sekretionsrate unter ACh zeigt. Ausschließlich in der 28-tägigen Expositionsgruppe findet sich keine signifikante Steigerung der Sekretion im Vergleich zur Basalsekretion. Dies deckt sich mit der bereits beschriebenen Beobachtung der in der Langzeitexposition erschöpften sekretagogischen Potenz. Hierdurch ergibt sich eine Signifikanz bei der Betrachtung der 28 Tages-Exposition gegenüber der Nativgruppe und der 2 Tages-Expositionsgruppe. Einen genauen Überblick über die Expositionswerte vermittelt Tabellen 3.1 bis 3.4 sowie 3.5 bis 3.10.

3.3 Untersuchung der Effekte der peptidergen Substanz P auf die Muzinsekretion

Substanz P (SP) wird eine Rolle innerhalb der peptidergen Non-Adrenergen, Non-Cholineren (NANC) Regulation der Muzinsekretion zugeschrieben. Als Mitglied der Tachikinfamilie wurde SP auch in unserer Arbeitsgruppe in Bezug auf seine sekretionssteigernde Potenz untersucht. Eine Stimulation der Muzinsekretion der Rattentrachea konnte in dosisabhängiger Weise aufgezeigt werden. Bei nicht exponierten SD-Ratten zeigte sich das Maximum der Sekretionsantwort von SP bei einer Konzentration von 10⁻⁶ mol/l (=1µM) mit rund 276%±16% der Basalsekretion

[174]. Diese Konzentration mit dem maximalen Effekt von SP auf die Mukussekretion bildete den Ausgangspunkt für die weiteren Untersuchungen.

Im Rahmen der Untersuchungen zur Wirkung des Mediators wurde SP an Fischerratten und an männlichen, spezifisch pathogenfreien Sprague-Dawley-Ratten getestet. Auch hier wurden Tiere scheinexponiert.

Die Menge des radioaktiv markierten Schleims wird im Folgenden mit absoluten Werten der Zählraten in cpm angegeben. Die Basalsekretion entspricht der nativen Sekretionsleistung der submukösen Drüsen. SP entspricht dabei einer Hinzugabe einer Menge von 1µM. Expositions- sowie stimulationsabhängige Änderungen der Sekretion werden im Folgenden demonstriert.

3.3.1 SP und sein Einfluss auf die tracheale Muzinsekretion bei der F344-Ratte

Tabelle 3.11 bis 3.14 sowie Abbildung 3.4 zeigen die basale und SP-stimulierte Muzinsekretion der Fischerrattentrachea in vitro nach 1 (n=19)-, 3 (n=18)- und 20 (n=24)-tägiger Exposition gegenüber 10 ppm NO₂ im Vergleich zu Kontrolltieren (n=28).

Tabelle 3.11 Basale und SP-stimulierte Muzinsekretion der nativen Fischerrattentrachea in vitro

	n	Mean	SD	CI	MEDIAN	Range
MW Basal cpm	28	49.65	33	[36.86 ; 62.45]	43.28	[26.42 ; 57.64]
SD Basal cpm	28	20.6	31.83	[8.25 ; 32.94]	12.16	[8.8 ; 18.59]
Median Basal cpm	28	45.19	27.71	[34.45 ; 55.94]	40.41	[26.24 ; 55.78]
SP 1µM	28	58.35	35.49	[44.59 ; 72.11]	50.72	[29.97 ; 78.39]
Diff. in cpm	28	8.7	28.24	[-2.25 ; 19.65]	7.96	[-2.86 ; 23.48]
% of basal	28	132.46	55.63	[110.89; 154.04]	130.44	[91.93 ; 172]

Tabelle 3.12 Basale und SP-stimulierte Muzinsekretion der Fischerrattentrachea in vitro nach 1-tägiger Exposition gegenüber 10 ppm NO₂

	n	Mean	SD	CI	MEDIAN	Range
MW Basal cpm	19	60.4	52.17	[35.26 ; 85.55]	43.26	[31.72 ; 81.69]
SD Basal cpm	19	26.6	38.24	[8.17 ; 45.03]	13.59	[7.07 ; 27.29]
Median Basal cpm	19	53.55	39.11	[34.7 ; 72.4]	35.89	[28.5 ; 69.17]
SP 1µM	19	91.76	89.79	[48.48 ; 135.04]	69.59	[53.4 ; 109.58]
Diff. in cpm	19	31.35	44.23	[10.04 ; 52.67]	28.07	[3.02 ; 43.34]
% of basal	19	160.75	66.58	[128.66 ; 192.8]	157.04	[109.38; 196.53]

Tabelle 3.13 Basale und SP-stimulierte Muzinsekretion der Fischerrattentrachea in vitro nach 3-tägiger Exposition gegenüber 10 ppm NO₂

	n	Mean	SD	CI	MEDIAN	Range
MW Basal cpm	18	45.45	17.65	[36.67 ; 54.23]	46.52	[37.66 ; 55.84]
SD Basal cpm	18	11.31	6.14	[8.25 ; 14.36]	9.13	[6.7 ; 13.82]
Median Basal cpm	18	44.43	19.32	[34.82 ; 54.04]	41.41	[34.46 ; 55.21]
SP 1µM	18	61.85	26.62	[48.61 ; 75.09]	62.21	[44.31 ; 75.92]
Diff. in cpm	18	16.4	18.41	[7.24 ; 25.55]	20.86	[6.68 ; 26.31]
% of basal	18	140.26	46.65	[117.06; 163.46]	140.03	[113.37; 165.24]

Tabelle 3.14 Basale und SP-stimulierte Muzinsekretion der Fischerrattentrachea in vitro nach 20-tägiger Exposition gegenüber 10 ppm NO₂

	n	Mean	SD	CI	MEDIAN	Range
MW Basal cpm	24	44.82	31.51	[31.51 ; 58.12]	33.35	[23.87 ; 59.07]
SD Basal cpm	24	14.91	12.04	[9.83 ; 19.99]	10.54	[8.47 ; 16.26]
Median Basal cpm	24	43.67	31.38	[30.42 ; 56.93]	30.68	[24.06 ; 58.31]
SP 1µM	24	63.5	48.83	[42.88 ; 84.12]	52.73	[28.47 ; 77.81]
Diff. in cpm	24	18.68	27.03	[7.26 ; 30.09]	11.06	[5.41 ; 25.91]
% of basal	24	147.8	73.12	[116.92; 178.67]	141.32	[115.62; 165.22]

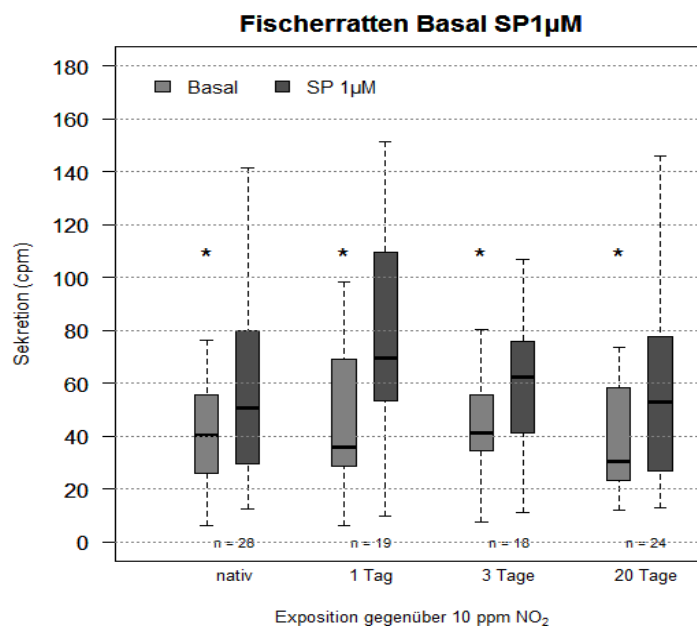


Abbildung 3.4 Basale und SP-stimulierte Muzinsekretion der Fischerrattentrachea in vitro nach 1-, 3- und 20- tägiger Exposition gegenüber 10 ppm NO₂ im Vergleich zu Kontrolltieren

Im Ergebnis zeigen sich sowohl bei den Kontrolltieren als auch bei den in unterschiedlicher Dauer gegenüber 10 ppm NO₂ exponierten Fischerratten signifikant höhere Sekretionsraten unter SP-Stimulation (*= p< 0,01; Wilcoxon-Test). Der Wilcoxon-Test untersucht den Unterschied innerhalb einer Rattenart bei fixem Zeitpunkt und vergleicht Median Basal versus SP-Stimulation.

Es zeigt sich keine signifikante ($p=0,348$; Kruskal-Wallis-Test) Änderung der SP-stimulierten Sekretionsrate im direkten Vergleich der Kontroll-, 1-Tages-, 3-Tages- und 20-Tages-Expositionsgruppe. Der Kruskal-Wallis-Test untersucht Unterschiede innerhalb einer Rattenart in Abhängigkeit der Länge der Exposition.

Die SP-stimulierte Muzinsekretion der F344-Ratten-Trachea zeigt in Tabelle 3.11 bis 3.14 und Abbildung 3.4 im Vergleich der untersuchten Gruppen eine in der Tendenz erkennbare, jedoch nicht signifikant höhere Sekretionsrate durch SP nach 1- und 3-Tages-Exposition (nativ: 50,72 cpm, 1d: 69,59 cpm, 3d: 62,21 cpm, 20d: 52,73 cpm).

3.3.2 SP und sein Einfluss auf die tracheale Muzinsekretion bei der SD-Ratte

Tabelle 3.15 bis 3.17 sowie Abbildung 3.5 zeigen die basale und die SP-stimulierte sekretorische Aktivität der untersuchten SD-Rattentracheen in vitro nach 3 ($n=13$)- und 20 ($n=9$)-tägiger Exposition gegenüber 10 ppm NO_2 im Vergleich zu Kontrolltieren ($n=7$).

Tabelle 3.15 Basale und SP-stimulierte Muzinsekretion der nativen SD-Ratten-Trachea in vitro

	n	Mean	SD	CI	MEDIAN	Range
MW Basal cpm	7	147.75	157.39	[2.19 ; 293.31]	79.98	[54.51 ; 197.47]
SD Basal cpm	7	45.9	53.76	[-3.82 ; 95.62]	19.06	[10.65 ; 63.11]
Median Basal cpm	7	146.64	152.78	[5.34 ; 287.94]	72.94	[54.91 ; 209.44]
SP 1 μ M	7	252.82	240.56	[32.33 ; 477.3]	175.06	[96.16 ; 316.59]
Diff. in cpm	7	107.07	158.83	[-39.83 ; 253.97]	29.68	[18.9 ; 151.82]
% of basal	7	226.21	133.44	[102.8 ; 349.62]	234.86	[125.72 ; 265.71]

Tabelle 3.16 Basale und SP-stimulierte Muzinsekretion der SD-Ratten-Trachea in vitro nach 3-tägiger Exposition gegenüber 10 ppm NO_2

	n	Mean	SD	CI	MEDIAN	Range
MW Basal cpm	13	112.68	60.28	[76.25 ; 149.1]	122.84	[59.48 ; 148.8]
SD Basal cpm	13	33.76	18.97	[22.29 ; 45.22]	30.43	[17.16 ; 48.74]
Median Basal cpm	13	107.08	57.36	[72.42 ; 141.74]	124.08	[72.69 ; 133.31]
SP 1 μ M	13	182.39	116.17	[112.19 ; 252.59]	136.83	[96.08 ; 260.59]
Diff. in cpm	13	69.72	91.66	[14.33 ; 125.1]	36.59	[10.19 ; 111.97]
% of basal	13	202.88	224.84	[67.01 ; 338.75]	158.51	[112.6 ; 177.65]

Tabelle 3.17 Basale und SP-stimierte Muzinsekretion der SD-Ratten-Trachea in vitro nach 20-tägiger Exposition gegenüber 10 ppm NO₂

	n	Mean	SD	CI	MEDIAN	Range
MW Basal cpm	9	147.15	34.93	[120.3 ; 174]	142.7	[130.71; 162.15]
SD Basal cpm	9	39.85	42.58	[7.12 ; 72.58]	27.93	[23.34 ; 34.14]
Median Basal cpm	9	143.95	26.44	[123.63 ; 164.28]	144.21	[140.94; 167.57]
SP 1µM	9	175.23	48.01	[138.33 ; 212.14]	154.77	[151.25; 194.52]
Diff. in cpm	9	28.08	53.18	[-12.79 ; 68.96]	37.23	[0.38 ; 68.25]
% of basal	9	123.62	37.22	[95.01 ; 152.23]	126.09	[100.25; 152.23]

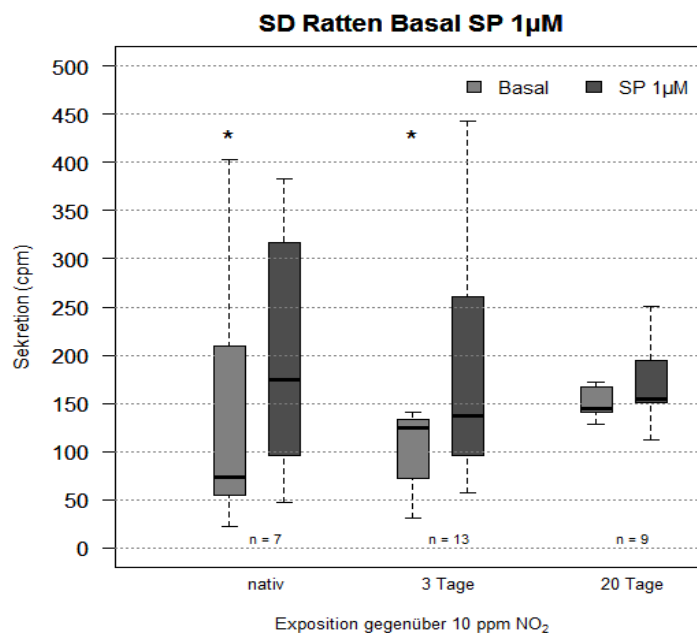


Abbildung 3.5 Basale und SP-stimierte Muzinsekretion der SD-Ratten-Trachea in vitro nach 3- und 20- tägiger Exposition gegenüber 10 ppm NO₂ im Vergleich zu Kontrolltieren

Im Ergebnis zeigen sich bei den Kontrolltieren (*= p=0,046; Wilcoxon-Test) und nach 3-Tages-Exposition (*= p<0,01) signifikant höhere Sekretionsraten nach Gabe von 1 µM SP. In der 20-Tages-Expositionsgruppe findet sich keine Signifikanz (p=0,074). Der Wilcoxon-Test untersucht den Unterschied innerhalb einer Rattenart bei fixem Zeitpunkt und vergleicht Median Basal versus SP-Stimulation.

Es zeigt sich keine signifikante (p>0,05; Kruskal-Wallis-Test) Änderung der SP-stimulierten Sekretionsrate im direkten Vergleich der Kontroll-, 3-Tages- und 20-Tages-Expositiongruppe. Der Kruskal-Wallis-Test untersucht Unterschiede innerhalb einer Rattenart in Abhängigkeit der Länge der Exposition.

Die SP-stimierte Muzinsekretion der SD-Ratten-Trachea zeigt in Tabelle 3.15 bis 3.17 und Abbildung 3.5 im Vergleich der untersuchten Gruppen eine in der Tendenz erkennbare, jedoch nicht signifikant höhere Sekretionsrate durch SP in der Kontrollgruppe (nativ: 175,06 cpm, 3d: 136,83 cpm, 20d: 154,77 cpm).

3.3.3 Untersuchung der Effekte von SP auf die Muzinsekretion: nativ und nach Kurz- und Langzeitexposition gegenüber 10 ppm NO₂ im Speziesvergleich

Weiterhin wurden Vergleiche vorgenommen, um einen Überblick zu erhalten, ob entsprechende NO₂-Expositionen auch bei jeder untersuchten Spezies mit einer vergleichbaren Antwort der schleimproduzierenden Zellen auf SP einhergehen.

Tabelle 3.11 bis 3.14 und 3.15 bis 3.17 sowie Abbildung 3.6 zeigen Sekretionsraten der SP (1 µM)-Stimulation der Fischer- und SD-Ratten-Trachea in vitro sowie nach 3 (n_{Fi}=18, n_{SD}=13)-, und 20 (n_{Fi}=24, n_{SD}=9)-Tages-Exposition gegenüber 10 ppm NO₂ im Vergleich zu Kontrolltieren (n_{Fi}=28, n_{SD}=7).

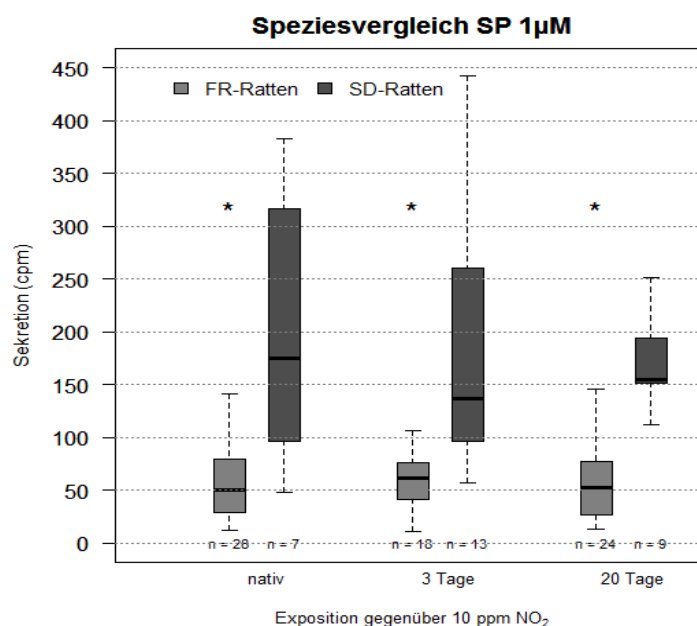


Abbildung 3.6 Sekretionsraten nach SP (1 µM)-Stimulation der Fischer- und SD-Ratten-Trachea in vitro nach 3- und 20- Tages-Exposition gegenüber 10 ppm NO₂ im Vergleich zu Kontrolltieren

Hier wurden Vergleiche zwischen zwei unabhängigen Gruppen mit dem nichtparametrischen Mann-Whitney U-Test durchgeführt. Somit konnten Unterschiede (Median SP 1µM in cpm) zwischen den zwei Rattenarten bei einem fixen Zeitpunkt untersucht werden.

Es zeigen sich im Vergleich zu den Fischerratten signifikant höhere Sekretionsraten sowohl bei den Kontrolltieren (*= p=0,003), als auch bei 3-Tages (*= p< 0,001) und 20-Tages (*= p< 0,001) exponierten SD-Ratten nach SP-Stimulation.

Abbildung 3.6 verdeutlicht noch einmal im Vergleich, bezugnehmend auf die Auswertungen durch den Kruskal-Wallis-Test unter Abbildung 3.4 und 3.5, dass die sekretorische Potenz von SP unter Langzeit- NO₂-Exposition im Vergleich zu den

Kontrolltieren bei beiden Spezies nicht signifikant zunimmt, wobei SD-Ratten wiederum ein erhöhtes Sekretionsniveau aufweisen.

3.4 Untersuchung des Einflusses des proinflammatorischen Zytokins GM-CSF auf die tracheale Muzinsekretion der NO₂-exponierten Ratten („Rattenmodell der COPD“) und im Vergleich zur nativen Rattentrachea

Den proinflammatorischen Zytokinen wird trotz diesbezüglich noch wenig umfangreicher Datenlage vermehrt eine Rolle bei der Regulation der Muzinsekretion zugeschrieben.

Im Rahmen dieser Untersuchungen zur Muzinregulation wird GM-CSF als proinflammatorisches Zytokin hinsichtlich seiner sekretagogen Wirkung an der nativen Rattentrachea von Fischerratten untersucht. Zusätzlich analysierten wir die Wirkung des GM-CSF auf die tracheobronchiale Muzinsekretion in unserem Rattenmodell der COPD, welches durch inhalative NO₂-Exposition bei der Fischerratte induziert wurde.

Die Menge des radioaktiv markierten Schleims wird im Folgenden mit relativen Werten der Zählraten in cpm (Median) angegeben. Die Basalsekretion entspricht der nativen Sekretionsleistung der submukösen Drüsen. GM-CSF entspricht dabei einer Hinzugabe einer Menge von 0,01 ng/ml bis 1,0 ng/ml. Die durch die Gabe von GM-CSF bedingte Sekretionsänderung wird in Bezug auf die Zählrate der vorausgehenden Leersammlungen (Basalsekretion=100%) durch eine prozentuale Angabe ausgedrückt (=Prozent der Basalsekretion).

3.4.1 Untersuchung der Effekte von GM-CSF auf die Muzinsekretion der nativen F344-Ratten-Trachea

Tabelle 3.18 bis 3.24 sowie Abbildung 3.7 zeigen die Ergebnisse von Untersuchungen hinsichtlich des modulierenden Effektes unterschiedlicher GM-CSF-Konzentrationen auf die sekretorische Aktivität nativer Fischerrattentracheen (n_{0,01ng/ml GM-CSF}=6, n_{0,05ng/ml GM-CSF}=6, n_{0,1ng/ml GM-CSF}=12, n_{0,15ng/ml GM-CSF}=8, n_{0,2ng/ml GM-CSF}=12, n_{0,4ng/ml GM-CSF}=11, n_{1,0ng/ml GM-CSF}=6).

Tabelle 3.18 Basale und GM-CSF (0,01 ng/ml) -stimulierte Muzinsekretion der nativen Fischerrattentrachea in vitro

	n	Mean	SD	CI	MEDIAN	Range
MW Basal cpm	6	77.64	47.56	[27.72 ; 127.55]	71.56	[35.77 ; 119.54]
SD Basal cpm	6	27.6	25.73	[0.46 ; 54.47]	18.07	[13.87 ; 25.47]
Median Basal cpm	6	73.78	53.09	[18.06 ; 129.5]	55	[32.24 ; 115.86]
GM-CSF 0,01ng/ml	6	76.21	61.61	[11.55 ; 140.87]	52.23	[34.12 ; 130.33]
Diff. in cpm	6	-1.43	29.57	[-32.46 ; 29.61]	10.45	[-9.65 ; 18.65]
% of basal	6	94.11	39.58	[52.57 ; 135.64]	115.38	[65.72 ; 116.98]

Tabelle 3.19 Basale und GM-CSF (0,05 ng/ml) -stimulierte Muzinsekretion der nativen Fischerrattentrachea in vitro

	n	Mean	SD	CI	MEDIAN	Range
MW Basal cpm	6	28.04	13.46	[13.91 ; 42.16]	22.76	[19.55 ; 39.21]
SD Basal cpm	6	10.26	4.86	[5.16 ; 15.35]	10.04	[6.62 ; 12.72]
Median Basal cpm	6	24.42	14.9	[8.78 ; 40.05]	17.5	[13.68 ; 34.05]
GM-CSF 0,05ng/ml	6	37.86	13.34	[23.85 ; 51.86]	37.01	[26.8 ; 48.92]
Diff. in cpm	6	9.82	13.78	[-4.64 ; 24.28]	9.05	[0.15 ; 14.77]
% of basal	6	152.4	67.68	[81.38; 223.43]	144.87	[97.08 ; 181.23]

Tabelle 3.20 Basale und GM-CSF (0,1 ng/ml) -stimulierte Muzinsekretion der nativen Fischerrattentrachea in vitro

	n	Mean	SD	CI	MEDIAN	Range
MW Basal cpm	12	28.91	17.98	[17.49 ; 40.34]	21.75	[19.32 ; 30.2]
SD Basal cpm	12	9.94	8.8	[4.35 ; 15.53]	6.91	[4.86 ; 10.13]
Median Basal cpm	12	27.99	20.76	[14.8 ; 41.18]	20.21	[17.69 ; 28.96]
GM-CSF 0,1 ng/ml	12	35.29	25.71	[18.96 ; 51.63]	26.16	[13.38 ; 55.5]
Diff. in cpm	12	6.38	27.34	[-10.99 ; 23.75]	-0.56	[-7.39 ; 14.38]
% of basal	12	146.92	150.67	[51.19; 242.64]	97.3	[68.35 ; 146.92]

Tabelle 3.21 Basale und GM-CSF (0,15 ng/ml) -stimulierte Muzinsekretion der nativen Fischerrattentrachea in vitro

	n	Mean	SD	CI	MEDIAN	Range
MW Basal cpm	8	20.73	14.05	[8.98 ; 32.48]	13.97	[12.36 ; 23.11]
SD Basal cpm	8	5.27	2.93	[2.83 ; 7.72]	4.8	[3.87 ; 7.13]
Median Basal cpm	8	21	13.71	[9.54 ; 32.46]	14.55	[13.04 ; 23.8]
GM-CSF 0,15ng/ml	8	15.23	7.34	[9.1 ; 21.37]	15.92	[10.14 ; 19.95]
Diff. in cpm	8	-5.5	17.2	[-19.87 ; 8.88]	0.6	[-14.09 ; 4.05]
% of basal	8	104.43	77.74	[39.43; 169.42]	104.31	[48.03 ; 129.26]

Tabelle 3.22 Basale und GM-CSF (0,2 ng/ml) -stimulierte Muzinsekretion der nativen Fischerrattentrachea in vitro

	n	Mean	SD	CI	MEDIAN	Range
MW Basal cpm	12	65.18	39.45	[40.11 ; 90.24]	52.99	[32.28 ; 94.15]
SD Basal cpm	12	14.73	9.32	[8.8 ; 20.65]	11.35	[7.29 ; 23.22]
Median Basal cpm	12	65.88	39.6	[40.72 ; 91.03]	53.32	[31.84 ; 92.84]
GM-CSF 0,2 ng/ml	12	88.59	56.4	[52.76 ; 124.42]	79.98	[48.58 ; 109.74]
Diff. in cpm	12	23.41	34.94	[1.21 ; 45.61]	19.53	[-4.53 ; 43.22]
% of basal	12	140.68	55.49	[105.42; 175.94]	134.22	[88.66 ; 198.76]

Tabelle 3.23 Basale und GM-CSF (0,4 ng/ml) -stimulierte Muzinsekretion der nativen Fischerrattentrachea in vitro

	n	Mean	SD	CI	MEDIAN	Range
MW Basal cpm	11	50.11	19.25	[37.18 ; 63.04]	48.39	[43.66 ; 59.85]
SD Basal cpm	11	14.47	9.47	[8.11 ; 20.84]	9.74	[6.94 ; 22.61]
Median Basal cpm	11	48.21	19.94	[34.81 ; 61.61]	48.49	[42.7 ; 58.44]
GM-CSF 0,4 ng/ml	11	63.77	34.65	[40.49 ; 87.05]	59.53	[39.67 ; 83.45]
Diff. in cpm	11	13.66	30.29	[-6.69 ; 34.01]	18.31	[-11.94 ; 23.63]
% of basal	11	133.63	70.98	[85.94 ; 181.31]	123.19	[73.39 ; 169.97]

Tabelle 3.24 Basale und GM-CSF (1,0 ng/ml) -stimulierte Muzinsekretion der nativen Fischerrattentrachea in vitro

	n	Mean	SD	CI	MEDIAN	Range
MW Basal cpm	6	75.65	57.13	[15.69 ; 135.61]	91.55	[23.33 ; 123.24]
SD Basal cpm	6	7.42	2.85	[4.43 ; 10.42]	7.19	[5.62 ; 8.19]
Median Basal cpm	6	74.86	56.9	[15.15 ; 134.56]	90.71	[23.27 ; 121.27]
GM-CSF 1,0ng/ml	6	98.63	94.44	[-0.47 ; 197.74]	88.45	[18.06 ; 147.68]
Diff. in cpm	6	22.98	54.77	[-34.5 ; 80.46]	-0.3	[-2.27 ; 21.61]
% of basal	6	116.95	50.03	[64.45 ; 169.45]	102.23	[90.22 ; 118.71]

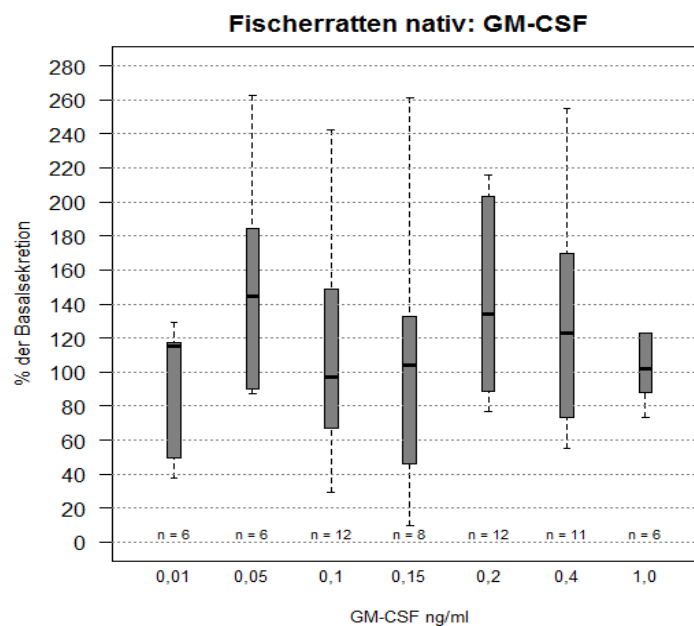


Abbildung 3.7 GM-CSF-stimulierte Muzinsekretion der nativen Fischerrattentrachea in vitro

Es zeigt sich keine signifikante ($p > 0,05$; Wilcoxon-Test) Steigerung der Sekretion nach GM-CSF in steigender Dosis im Vergleich zur basalen Sekretionsrate an der nativen Fischerratten-Trachea ($p = 0,844$ bei 0,01 ng/ml GM-CSF; $p = 0,062$ bei 0,05 ng/ml GM-CSF; $p = 0,625$ ng/ml bei 0,1 ng/ml GM-CSF; $p = 0,742$ bei 0,15 ng/ml GM-CSF; $p = 0,092$ bei 0,2 ng/ml GM-CSF; $p = 0,147$ bei 0,4 ng/ml GM-CSF, $p = 0,844$ bei 1,0 ng/ml GM-

CSF). Der Wilcoxon-Test untersucht den Unterschied innerhalb einer Rattenart bei fixem Zeitpunkt und vergleicht Median Basal versus GM-CSF-Gabe.

Es zeigt sich darüber hinaus keine signifikante ($p=0,641$; Kruskal-Wallis-Test) Änderung beim direkten Vergleich der unterschiedlichen GM-CSF-Dosen. Der Kruskal-Wallis-Test untersucht Unterschiede innerhalb einer Rattenart in Abhängigkeit der Dosis von GM-CSF.

3.4.2 Untersuchung der Effekte von GM-CSF auf die tracheobronchiale Muzinsekretion nach Kurz- und Langzeitexposition der F344-Ratte gegenüber 10 ppm NO₂

Tabelle 3.19 bis 3.23 und 3.25 bis 3.39 sowie Abbildung 3.8 zeigen die basale und die GM-CSF-stimulierte sekretorische Aktivität der untersuchten Fischerrattentracheen nach 1 (n_{0,05ng/ml GM-CSF}=6, n_{0,1ng/ml GM-CSF}=12, n_{0,15ng/ml GM-CSF}=8, n_{0,2ng/ml GM-CSF}=11, n_{0,4ng/ml GM-CSF}=5)-, 3 (n_{0,05ng/ml GM-CSF}=6, n_{0,1ng/ml GM-CSF}=12, n_{0,15ng/ml GM-CSF}=7, n_{0,2ng/ml GM-CSF}=14, n_{0,4ng/ml GM-CSF}=7)- und 20 (n_{0,05ng/ml GM-CSF}=6, n_{0,1ng/ml GM-CSF}=15, n_{0,15ng/ml GM-CSF}=11, n_{0,2ng/ml GM-CSF}=18, n_{0,4ng/ml GM-CSF}=6)- tägiger Exposition gegenüber 10 ppm NO₂ im Vergleich zu Kontrolltieren (n_{0,05ng/ml GM-CSF}=6, n_{0,1ng/ml GM-CSF}=12, n_{0,15ng/ml GM-CSF}=8, n_{0,2ng/ml GM-CSF}=12, n_{0,4ng/ml GM-CSF}=11). Im Folgenden wird die Darstellung einer Konzentrations-Wirkungs-Beziehung unter Berücksichtigung der Expositionsdauer gezeigt.

Tabelle 3.25 Basale und GM-CSF (0,05 ng/ml)-stimulierte Muzinsekretion der Fischerrattentrachea in vitro nach 1-tägiger Exposition gegenüber 10 ppm NO₂

	n	Mean	SD	CI	MEDIAN	Range
MW Basal cpm	6	34.04	21.82	[11.14 ; 56.94]	31.15	[17.83 ; 49.13]
SD Basal cpm	6	12.35	5.3	[6.79 ; 17.91]	11.18	[9.25 ; 15.56]
Median Basal cpm	6	31.21	19.31	[10.94 ; 51.48]	29.84	[14.93 ; 45.57]
GM-CSF 0,05ng/ml	6	28.03	18.31	[8.81 ; 47.24]	27.45	[15.25 ; 39.15]
Diff. in cpm	6	-6.02	13.47	[-20.15 ; 8.11]	0.4	[-16.53 ; 3.45]
% of basal	6	95.19	49.12	[43.64 ; 146.74]	101.15	[71.73 ; 122.67]

Tabelle 3.26 Basale und GM-CSF (0,05 ng/ml)-stimulierte Muzinsekretion der Fischerrattentrachea in vitro nach 3-tägiger Exposition gegenüber 10 ppm NO₂

	n	Mean	SD	CI	MEDIAN	Range
MW Basal cpm	6	50.17	14.69	[34.75 ; 65.59]	43.69	[42.5 ; 60.96]
SD Basal cpm	6	11.47	7.04	[4.09 ; 18.86]	10.82	[5.28 ; 17.57]
Median Basal cpm	6	48.93	11.51	[36.85 ; 61]	45.44	[42.97 ; 55.25]
GM-CSF 0,05ng/ml	6	49.31	11.32	[37.44 ; 61.19]	49.12	[44.14 ; 53.66]
Diff. in cpm	6	-0.86	8.48	[-9.75 ; 8.04]	0.35	[-0.75 ; 1.53]
% of basal	6	100.36	14.72	[84.92 ; 115.8]	100.69	[97.7 ; 103.46]

Tabelle 3.27 Basale und GM-CSF (0,05 ng/ml)-stimulierte Muzinsekretion der Fischerrattentrachea in vitro nach 20-tägiger Exposition gegenüber 10 ppm NO₂

	n	Mean	SD	CI	MEDIAN	Range
MW Basal cpm	6	60.1	76.89	[1 ; 119.19]	37.12	[13.55 ; 65.69]
SD Basal cpm	6	40.22	92.14	[-30.6 ; 111.05]	7.14	[6.19 ; 19.02]
Median Basal cpm	6	39.93	30.34	[16.6 ; 63.25]	37.63	[14.75 ; 62.87]
GM-CSF 0,05ng/ml	6	41.04	19.93	[25.73 ; 56.36]	38.63	[23.8 ; 56.84]
Diff. in cpm	6	-19.05	61.44	[-66.27 ; 28.17]	1.51	[-8.85 ; 7.94]
% of basal	6	125.51	69.93	[71.75; 179.27]	104.06	[86.53 ; 173.36]

Tabelle 3.28 Basale und GM-CSF (0,1 ng/ml)-stimulierte Muzinsekretion der Fischerrattentrachea in vitro nach 1-tägiger Exposition gegenüber 10 ppm NO₂

	n	Mean	SD	CI	MEDIAN	Range
MW Basal cpm	12	47.55	32.64	[26.81 ; 68.29]	49.5	[13.18 ; 79.75]
SD Basal cpm	12	28.57	41.42	[2.25 ; 54.89]	11.04	[6.04 ; 20.53]
Median Basal cpm	12	39.23	26.6	[22.33 ; 56.14]	38.06	[14.18 ; 50.18]
GM-CSF 0,1ng/ml	12	42.55	33.87	[21.02 ; 64.07]	41.25	[21.1 ; 50.72]
Diff. in cpm	12	-5.01	20.24	[-17.86 ; 7.85]	-4.78	[-15.17 ; 10.44]
% of basal	12	90.05	50.99	[57.65; 122.44]	70.5	[53.66 ; 126.69]

Tabelle 3.29 Basale und GM-CSF (0,1 ng/ml)-stimulierte Muzinsekretion der Fischerrattentrachea in vitro nach 3-tägiger Exposition gegenüber 10 ppm NO₂

	n	Mean	SD	CI	MEDIAN	Range
MW Basal cpm	12	46.28	24.92	[30.45 ; 62.11]	42.21	[35.41 ; 62.64]
SD Basal cpm	12	10.41	4.6	[7.49 ; 13.33]	9.92	[7.53 ; 14.3]
Median Basal cpm	12	44.1	24.12	[28.77 ; 59.42]	42.5	[31.31 ; 57.81]
GM-CSF 0,1ng/ml	12	64.42	35.63	[41.79 ; 87.06]	60.62	[43.01 ; 83.02]
Diff. in cpm	12	18.14	27.43	[0.71 ; 35.58]	12.98	[5.3 ; 20.95]
% of basal	12	159.89	100.93	[95.76; 224.02]	129.14	[112.02; 143.08]

Tabelle 3.30 Basale und GM-CSF (0,1 ng/ml)-stimulierte Muzinsekretion der Fischerrattentrachea in vitro nach 20-tägiger Exposition gegenüber 10 ppm NO₂

	n	Mean	SD	CI	MEDIAN	Range
MW Basal cpm	15	39.83	19.6	[28.97 ; 50.68]	42.56	[20.5 ; 58.95]
SD Basal cpm	15	12.79	16.74	[3.52 ; 22.06]	8.59	[5.95 ; 11.72]
Median Basal cpm	15	38.67	20.25	[27.46 ; 49.88]	34.87	[19.79 ; 57.59]
GM-CSF 0,1 ng/ml	15	45.34	25.98	[30.95 ; 59.73]	38.89	[22.05 ; 64.38]
Diff. in cpm	15	5.51	13.75	[-2.1 ; 13.13]	7.04	[-2.2 ; 13.73]
% of basal	15	116.57	40.96	[93.89; 139.26]	115.38	[92.51 ; 138.61]

Tabelle 3.31 Basale und GM-CSF (0,15 ng/ml)-stimulierte Muzinsekretion der Fischerrattentrachea in vitro nach 1-tägiger Exposition gegenüber 10 ppm NO₂

	n	Mean	SD	CI	MEDIAN	Range
MW Basal cpm	8	32.65	14.28	[20.71 ; 44.59]	29.37	[22.52 ; 44.69]
SD Basal cpm	8	9.35	3.52	[6.41 ; 12.29]	7.82	[6.95 ; 10.8]
Median Basal cpm	8	32.09	14.15	[20.26 ; 43.92]	27.25	[20.92 ; 43.59]
GM-CSF 0,15ng/ml	8	33.79	11.33	[24.32 ; 43.26]	35.21	[28.38 ; 41.25]
Diff. in cpm	8	1.13	9.17	[-6.54 ; 8.8]	3.22	[-7.02 ; 5.99]
% of basal	8	112.16	41.48	[77.48; 146.83]	109.25	[83.43 ; 119.03]

Tabelle 3.32 Basale und GM-CSF (0,15 ng/ml)-stimulierte Muzinsekretion der Fischerrattentrachea in vitro nach 3-tägiger Exposition gegenüber 10 ppm NO₂

	n	Mean	SD	CI	MEDIAN	Range
MW Basal cpm	7	48.13	20.34	[29.32 ; 66.94]	55.96	[35.09 ; 63.5]
SD Basal cpm	7	9.09	3.02	[6.3 ; 11.88]	9.73	[6.3 ; 11.51]
Median Basal cpm	7	47.36	19.15	[29.64 ; 65.07]	56.18	[34.79 ; 61.03]
GM-CSF 0,15ng/ml	7	54.61	34.55	[22.66 ; 86.56]	47.12	[28 ; 79.9]
Diff. in cpm	7	6.48	19.39	[-11.45 ; 24.42]	5.53	[-6.09 ; 17.31]
% of basal	7	107.77	36.07	[74.41; 141.12]	116.5	[90.28 ; 128.05]

Tabelle 3.33 Basale und GM-CSF (0,15 ng/ml)-stimulierte Muzinsekretion der Fischerrattentrachea in vitro nach 20-tägiger Exposition gegenüber 10 ppm NO₂

	n	Mean	SD	CI	MEDIAN	Range
MW Basal cpm	11	57.57	32.03	[36.05 ; 79.09]	48.86	[36.27 ; 75.67]
SD Basal cpm	11	8.19	3.11	[6.1 ; 10.28]	6.65	[6.02 ; 10.17]
Median Basal cpm	11	57.47	32.48	[35.64 ; 79.29]	47.12	[35.72 ; 74.62]
GM-CSF 0,15ng/ml	11	69.29	30.41	[48.87 ; 89.72]	58.19	[49.46 ; 88.95]
Diff. in cpm	11	11.72	12.03	[3.64 ; 19.8]	14.99	[2.51 ; 21.13]
% of basal	11	128.77	34.19	[105.8; 151.73]	121.24	[104.76; 143.24]

Tabelle 3.34 Basale und GM-CSF (0,2 ng/ml)-stimulierte Muzinsekretion der Fischerrattentrachea in vitro nach 1-tägiger Exposition gegenüber 10 ppm NO₂

	n	Mean	SD	CI	MEDIAN	Range
MW Basal cpm	11	62.49	28.06	[43.64 ; 81.34]	53.35	[47.79 ; 65.73]
SD Basal cpm	11	28.22	35.38	[4.45 ; 51.99]	21.74	[14.71 ; 25.41]
Median Basal cpm	11	52.74	18.71	[40.17 ; 65.3]	48.55	[38.81 ; 63.88]
GM-CSF 0,2 ng/ml	11	60.12	22.42	[45.06 ; 75.18]	54.5	[44.86 ; 67.24]
Diff. in cpm	11	-2.37	36.78	[-27.08 ; 22.34]	-6.88	[-18.94 ; 18.86]
% of basal	11	109.89	57.89	[71 ; 148.79]	85.3	[71.07 ; 144.25]

Tabelle 3.35 Basale und GM-CSF (0,2 ng/ml)-stimulierte Muzinsekretion der Fischerrattentrachea in vitro nach 3-tägiger Exposition gegenüber 10 ppm NO₂

	n	Mean	SD	CI	MEDIAN	Range
MW Basal cpm	14	55.01	25.3	[40.4 ; 69.62]	49.31	[40.57 ; 55.5]
SD Basal cpm	14	16.45	10.33	[10.49 ; 22.41]	13.97	[9.62 ; 19.62]
Median Basal cpm	14	53.16	26.21	[38.03 ; 68.3]	44.1	[40.82 ; 58.41]
GM-CSF 0,2 ng/ml	14	63.85	48.83	[35.65 ; 92.05]	42	[34.79 ; 82.04]
Diff. in cpm	14	8.84	27.21	[-6.86 ; 24.55]	-0.27	[-8.64 ; 20.84]
% of basal	14	108.63	37.6	[86.92 ; 130.34]	99.77	[78.18 ; 141.4]

Tabelle 3.36 Basale und GM-CSF (0,2 ng/ml)-stimulierte Muzinsekretion der Fischerrattentrachea in vitro nach 20-tägiger Exposition gegenüber 10 ppm NO₂

	n	Mean	SD	CI	MEDIAN	Range
MW Basal cpm	18	65.26	51.58	[39.61 ; 90.9]	55.82	[26.08 ; 90.42]
SD Basal cpm	18	24.15	34.58	[6.96 ; 41.35]	12.71	[8.04 ; 20.73]
Median Basal cpm	18	58.71	49.52	[34.09 ; 83.34]	51.35	[27.46 ; 67.92]
GM-CSF 0,2 ng/ml	18	73.95	62.91	[42.66 ; 105.23]	62.79	[34 ; 81.58]
Diff. in cpm	18	8.69	27.04	[-4.75 ; 22.14]	8.97	[2.67 ; 19.87]
% of basal	18	150.24	131.95	[84.62 ; 215.86]	119.65	[103.55; 150.01]

Tabelle 3.37 Basale und GM-CSF (0,4 ng/ml)-stimulierte Muzinsekretion der Fischerrattentrachea in vitro nach 1-tägiger Exposition gegenüber 10 ppm NO₂

	n	Mean	SD	CI	MEDIAN	Range
MW Basal cpm	5	57.03	32.08	[17.2 ; 96.86]	65.56	[38.4 ; 84.76]
SD Basal cpm	5	33.07	28.73	[-2.61 ; 68.74]	18.63	[14.95 ; 51.76]
Median Basal cpm	5	56.49	40.55	[6.14 ; 106.83]	42.93	[32.36 ; 81.21]
GM-CSF 0,4 ng/ml	5	87.93	96.9	[-32.39 ; 208.24]	66.25	[29.66 ; 68.58]
Diff. in cpm	5	30.9	95.12	[-87.21 ; 149]	7.45	[-18.51 ; 30.18]
% of basal	5	170.15	137.77	[-0.91 ; 341.21]	167.73	[78.16 ; 178.59]

Tabelle 3.38 Basale und GM-CSF (0,4 ng/ml)-stimulierte Muzinsekretion der Fischerrattentrachea in vitro nach 3-tägiger Exposition gegenüber 10 ppm NO₂

	n	Mean	SD	CI	MEDIAN	Range
MW Basal cpm	7	39.52	17.19	[23.62 ; 55.42]	36.89	[28.87 ; 43.76]
SD Basal cpm	7	8.84	4.25	[4.91 ; 12.78]	7.97	[6.1 ; 10.12]
Median Basal cpm	7	39.48	18.08	[22.76 ; 56.2]	36.3	[28.64 ; 45.52]
GM-CSF 0,4 ng/ml	7	49.89	28.15	[23.85 ; 75.92]	37.56	[33.52 ; 65.23]
Diff. in cpm	7	10.36	13.02	[-1.68 ; 22.41]	8.53	[0.72 ; 17.56]
% of basal	7	121.2	27.92	[95.38 ; 147.02]	128.97	[102.04; 134.04]

Tabelle 3.39 Basale und GM-CSF (0,4 ng/ml)-stimulierte Muzinsekretion der Fischerrattentrachea in vitro nach 20-tägiger Exposition gegenüber 10 ppm NO₂

	n	Mean	SD	CI	MEDIAN	Range
MW Basal cpm	6	69.84	40.09	[27.77 ; 111.91]	60.47	[40.95 ; 94.36]
SD Basal cpm	6	14.79	8.24	[6.14 ; 23.44]	12.71	[8.84 ; 20.56]
Median Basal cpm	6	68.14	41.04	[25.06 ; 111.21]	59.15	[34.18 ; 94.36]
GM-CSF 0,4 ng/ml	6	86.7	45.31	[39.15 ; 134.25]	79.56	[68.83 ; 112.3]
Diff. in cpm	6	16.86	17.64	[-1.65 ; 35.37]	22.03	[4.1 ; 23.85]
% of basal	6	128.77	44.16	[82.43 ; 175.12]	119.66	[102.59; 149.03]

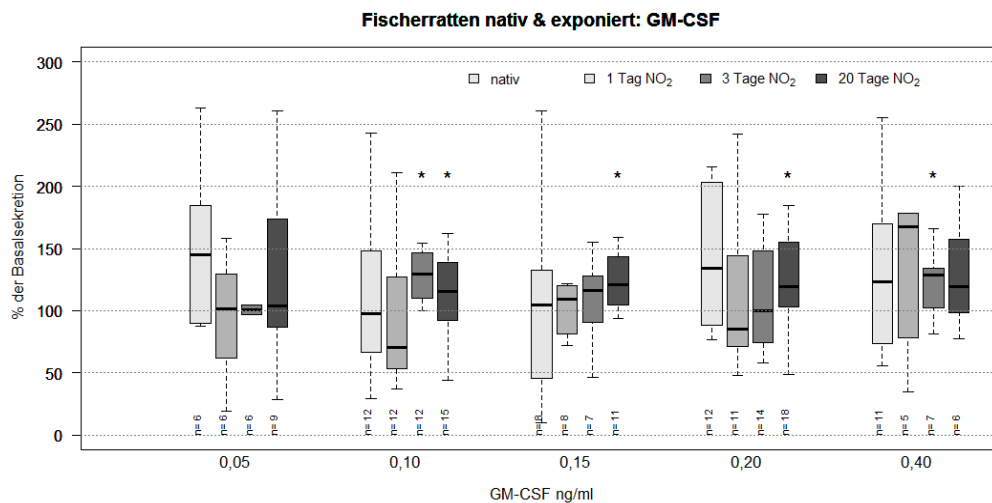


Abbildung 3.8 GM-CSF-stimulierte Muzinsekretion der Fischerrattentrachea in vitro nach 1-, 3- und 20-tägiger Exposition gegenüber 10 ppm NO₂ im Vergleich zu Kontrolltieren

Es werden Unterschiede innerhalb einer Rattenart bei fixem Zeitpunkt untersucht (Wilcoxon-Test) und Basal versus GM-CSF-Gabe verglichen.

Im Ergebnis zeigt sich eine signifikante ($p < 0,05$) Steigerung der Sekretion nach GM-CSF in folgenden Dosen bzw. Expositionszeiten.

3 Tages-Exposition:

$p = 0,001$ bei 0,1 ng/ml GM-CSF; $p = 0,047$ bei 0,4 ng/ml GM-CSF.

20 Tages-Exposition:

$p = 0,046$ bei 0,1 ng/ml GM-CSF; $p = 0,009$ bei 0,15 ng/ml GM-CSF; $p < 0,001$ bei 0,2 ng/ml GM-CSF.

Des Weiteren zeigt sich keine signifikante Steigerung der Sekretion nach GM-CSF-Gabe in allen übrigen Dosen bzw. Expositionszeiten, welche im Folgenden nochmals aufgeführt werden.

Native Gruppe:

p=0,062 bei 0,05 ng/ml GM-CSF; p=0,625 ng/ml 0,1 ng/ml GM-CSF; p=0,742 bei 0,15 ng/ml GM-CSF; p=0,092 bei 0,2 ng/ml GM-CSF; p=0,147 bei 0,4 ng/ml GM-CSF.

1 Tages-Exposition:

p=0,812 bei 0,05 ng/ml GM-CSF; p=0,47 ng/ml 0,1 ng/ml GM-CSF; p=0,641 bei 0,15 ng/ml GM-CSF; p=0,465 bei 0,2 ng/ml GM-CSF; p=0,812 bei 0,4 ng/ml GM-CSF.

3 Tages-Exposition:

p=0,844 bei 0,05 ng/ml GM-CSF; p=0,469 bei 0,15 ng/ml GM-CSF; p=0,235 bei 0,2 ng/ml GM-CSF.

20 Tages-Exposition:

p=0,285 bei 0,05 ng/ml GM-CSF; p=0,156 bei 0,4 ng/ml GM-CSF.

Zusammenfassend zeigt Abbildung 3.8 einen Überblick über die Ergebnisse der verschiedenen GM-CSF-Konzentrationen zusammen mit den maximal erreichten sekretagogen Effekten der jeweiligen Konzentration bei unterschiedlicher Expositionszeit gegenüber 10 ppm NO₂. Bei den Kontrolltieren und unter 1-Tages-Exposition führt GM-CSF in jeder untersuchten Konzentration weder zu einer relevanten Verstärkung noch zu einer Verringerung der Mukussekretion. Mit zunehmender Exposition wird für GM-CSF bei einer Konzentration von 0,10 ng/ml (3d: 129,14 %, 20d: 115,38 %); 0,15 ng/ml (20d: 121,24 %); 0,2 ng/ml (20d: 119,65 %) und 0,4 ng/ml (3d: 128,97 %) ein signifikanter Anstieg der Muzinsekretion dokumentiert.

3.4.3 Hervorhebung der Effekte von GM-CSF auf die Muzinsekretion der langzeitexponierten F344-Ratten-Trachea

Zur Verdeutlichung der durch GM-CSF hervorgerufenen Effekte zeigt folgende Abbildung nochmals die 20-Tages-exponierten Tiere.

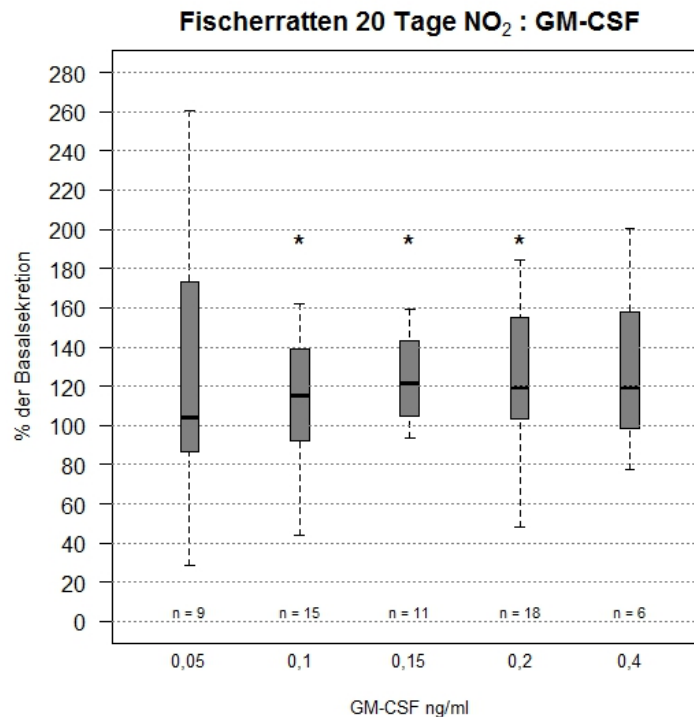


Abbildung 3.9 GM-CSF-stimulierte Muzinsekretion der Fischerrattentrachea *in vitro* nach 20-tägiger Exposition gegenüber 10 ppm NO₂

Es zeigen sich nach 20-Tages-Exposition signifikant höhere Sekretionsraten nach GM-CSF 0,10 ng/ml ($p=0,046$; Wilcoxon-Test), nach GM-CSF 0,15 ng/ml ($p=0,009$) und nach GM-CSF 0,2 ng/ml ($p<0,001$). Für die GM-CSF-Konzentration von 0,2 ng/ml ergibt sich folglich eine hohe Signifikanz und erreicht mit 62,79 cpm (basal 51,35 cpm) 119,65% der basalen Muzinsekretion.

Somit zeigt sich keine signifikante Steigerung der Sekretion nach GM-CSF 0,05 ng/ml ($p=0,285$) und GM-CSF 0,4 ng/ml ($p=0,156$).

3.4.4 Untersuchung möglicher Interaktionen zwischen SP und GM-CSF bei der Stimulation der Muzinsekretion

Zur Überprüfung potentieller Wechselwirkungen zwischen dem sensorischen Neuropeptid SP und dem proinflammatorischen Zytokin GM-CSF wurden folgende Versuchsansätze gewählt. Um Veränderungen bezüglich der Muzinsekretion zu überprüfen, wurden die Substanzen GM-CSF und SP gewählt, da ein eindeutig stimulierender Effekt der einzelnen Mediatoren, wie bereits oben gezeigt, nachweisbar ist. Bei 20-Tages-Exposition findet sich eine signifikante Zunahme der Muzinsekretion durch die muköse Gabe von GM-CSF 0,2 ng/ml mit 119,65 % der Basalsekretion ($p<0,001$). Diese Konzentration bildet daher die Grundlage für unsere Kombinationsversuche. Für SP ist die Konzentration von 1 μ M gewählt worden, da diese in Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe den stärksten stimulierenden Effekt

erreichte und auch in dieser Arbeit bei den Fischerratten sowohl in der Kontrollgruppe als auch bei allen Expositionsgruppen, wie die jetzt gewählte 20-Tages-Exposition, signifikante Werte zeigt ($p < 0,01$).

Tabelle 3.40 bis 3.42 sowie Abbildung 3.10 zeigen die Wirkung auf die Muzinsekretion der Fischerrattentrachea durch die Einzelsubstanzen sowie die der kombinierten Gabe von SP und GM-CSF nach 20-tägiger Exposition gegenüber 10 ppm NO₂ (n=11).

Die Menge des radioaktiv markierten Schleims wird im Folgenden mit relativen Werten der Zählraten in cpm (Median) angegeben. Die Basalsekretion entspricht der nativen Sekretionsleistung der submukösen Drüsen. GM-CSF entspricht dabei einer Hinzugabe einer Menge von 0,2 ng/ml, SP einer Menge von 1 µM. In der kombinierten Gabe werden die gleichen Konzentrationen verwendet. Die Sekretionsänderung wird in Bezug auf die Zählrate der vorausgehenden Leersammlungen (Basalsekretion=100%) durch eine prozentuale Angabe ausgedrückt (=Prozent der Basalsekretion).

Tabelle 3.40 Basale und SP-stimulierte Muzinsekretion der Fischerrattentrachea in vitro nach 20-tägiger Exposition gegenüber 10 ppm NO₂

	n	Mean	SD	CI	MEDIAN	Range
MW Basal cpm	11	36.06	23.87	[20.02 ; 52.09]	25.52	[23.83 ; 47.02]
SD Basal cpm	11	18.06	14.03	[9.17 ; 28.02]	14.63	[7.91 ; 23.88]
Median Basal cpm	11	34.21	24.29	[17.89 ; 50.53]	26.15	[16.52 ; 46.11]
SP 1 µM	11	57.56	47.36	[25.74 ; 89.38]	36.89	[21.8 ; 86.35]
Diff. in cpm	11	21.5	29.09	[1.96 ; 41.04]	8.65	[4.98 ; 35.2]
% of basal	11	157.37	92.34	[95.34 ; 219.4]	140.35	[123.8 ; 158.19]

Tabelle 3.41 Basale und GM-CSF-stimulierte Muzinsekretion der Fischerrattentrachea in vitro nach 20-tägiger Exposition gegenüber 10 ppm NO₂

	n	Mean	SD	CI	MEDIAN	Range
MW Basal cpm	11	67.59	59.07	[27.91 ; 107.27]	58.69	[24.56 ; 84.42]
SD Basal cpm	11	22.11	15.57	[11.65 ; 32.56]	17.11	[12.71 ; 25.31]
Median Basal cpm	11	63	60.16	[22.58 ; 103.42]	39.91	[24.64 ; 70.5]
GM-CSF 0,2 ng/ml	11	80.7	78.01	[28.29 ; 133.11]	37.9	[33.12 ; 100.19]
Diff. in cpm	11	13.11	24.3	[-3.21 ; 29.44]	9.4	[3.1 ; 18.78]
% of basal	11	122.6	37.59	[97.35 ; 147.86]	122.96	[103.38 ; 134.81]

Tabelle 3.42 Basale und SP (1 μ M)/ GM-CSF(0,2 ng/ml)-stimulierte Muzinsekretion der Fischerrattentrachea in vitro nach 20-tägiger Exposition gegenüber 10 ppm NO₂

	n	Mean	SD	CI	MEDIAN	Range
MW Basal cpm	11	75.88	67.94	[30.24 ; 121.52]	47.33	[32.87 ; 90.63]
SD Basal cpm	11	14.47	8.99	[8.43 ; 20.51]	13.25	[8.05 ; 17.89]
Median Basal cpm	11	74.14	67.78	[28.6 ; 119.67]	42.68	[30.23 ; 89.25]
SP + GM-CSF	11	108.14	116.21	[30.07 ; 186.21]	68.08	[51.73 ; 118.29]
Diff. in cpm	11	32.26	57.14	[-6.13 ; 70.65]	15.47	[8.18 ; 42.75]
% of basal	11	144.16	50.51	[110.23 ; 178.1]	140.71	[113.74; 166.89]

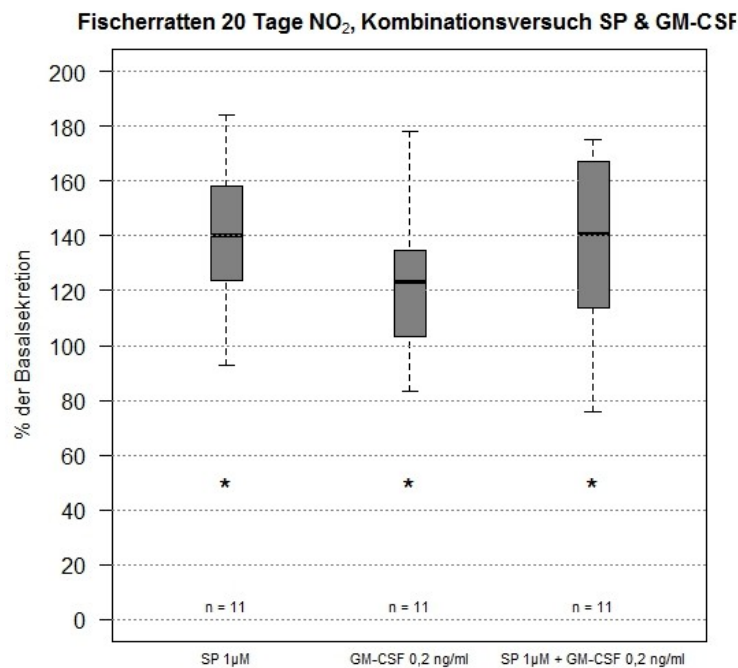


Abbildung 3.10 Sekretionsrate der SP- und GM-CSF- Stimulation der Fischerrattentrachea in vitro nach alleiniger Gabe und in Kombination nach 20-tägiger Exposition gegenüber 10 ppm NO₂

Es zeigt sich eine signifikante Steigerung der Sekretion nach Gabe der Einzelsubstanzen SP ($p=0,014$; Wilcoxon-Test) und GM-CSF ($p=0,01$) sowie nach kombinierter Gabe ($p=0,019$). Der Wilcoxon-Test untersucht den Unterschied innerhalb einer Rattenart bei fixem Zeitpunkt und vergleicht Median Basal versus SP 1 μ M, Median Basal versus GM-CSF 0,2 ng/ml oder Median Basal versus SP 1 μ M + GM-CSF 0,2 ng/ml.

Es ergibt sich kein signifikanter Unterschied im direkten Vergleich der Einzelsubstanzen und der kombinierten Gabe (Friedman Test, $p=0,529$).

Zusammenfassend kommt es bei kombinierter muköser Gabe von SP und GM-CSF zu keinem messbaren additiven Effekt in der sekretagogen Wirkung oder signifikanten Änderung der Sekretion im Vergleich zur alleinigen Gabe einer der beiden Substanzen (SP: 140,35% ; GM-CSF: 122,96% ; SP+GM-CSF: 140,71% der Basalsekretion).

3.5 Zusammenfassung

In dieser Arbeit kann sowohl für die Fischerratten, als auch für die SD-Ratten keine signifikante Änderung des basalen Sekretionsniveaus nach Kurz- oder Langzeit NO₂-Exposition gegenüber 10ppm NO₂ nachgewiesen werden.

In der Tendenz zeigt sich jedoch bei beiden Spezies eine gleichsinnige zeitabhängige Auswirkung von NO₂ auf die Muzinsekretion (1 Tag: Anstieg der Sekretion, 3 Tage: Sekretionsabfall, jedoch nicht unter das Niveau der Kontrollgruppe, 20 Tage: Sekretionsmaximum).

Die SD-Ratten zeigen im Vergleich zu den Fischerratten eine signifikant höhere Basalsekretion sowohl in der Kontrollgruppe als auch in der Kurz- und Langzeitexposition gegenüber NO₂.

Der cholinerg wirksame Stimulator ACh zeigt in unserem Rattenmodell der COPD bei beiden Spezies mit zunehmender Expositionszeit eine signifikante sekretagoge Wirkung (Ausnahme: 28-Tages-Exposition der SD-Ratte).

Bei den Fischerratten ergeben sich unter ACh-Stimulation nach 3 Tagen sowie 20 Tagen jeweilig signifikante expositionverstärkende Effekte gegenüber der Nativ-Gruppe.

Bei den SD-Ratten zeigt sich ein signifikanter Verlust der Stimulierbarkeit der Muzinsekretion durch ACh in der 28-Tages-Expositionsgruppe im Vergleich zur Kontrolle und Kurzzeitexposition.

Die Gabe von Substanz P führt bei den Fischerratten zu einem signifikant höheren Sekretionsniveau sowohl bei den nichtexponierten Tieren als auch bei allen untersuchten Expositionsgruppen. Bei den SD-Ratten erhalten wir gleichartige Ergebnisse, allerdings ohne Signifikanz nach 20-tägiger Exposition.

GM-CSF stimuliert die tracheale Muzinsekretion nach 3-Tages- und 20-Tages-Exposition bei der Fischerratte in dosisabhängiger Weise. Hierbei zeigt GM-CSF bei den Fischerratten signifikante sekretagoge Effekte in einer Konzentration zwischen 0,1 ng/ml und 0,4 ng/ml. Unter Stimulation von 0,2 ng/ml GM-CSF unter 20-tägiger NO₂ Exposition wird ein hochsignifikantes Ergebnis von 119,65% der Basalsekretion erreicht. Somit wirkt GM-CSF in unserem Rattenmodell der COPD deutlich sekretagog.

In unserem Kombinationsversuch lassen sich keine Wechselwirkungen von GM-CSF zum Tachykinin SP in Bezug auf ihre sekretagoge Wirkung feststellen.

4 Diskussion

Die COPD hat einen zunehmenden Stellenwert in Bezug auf Morbidität und Mortalität weltweit. Die langsame Progression der COPD führt zu einer herabgesetzten Lebensqualität, zu einer möglichen Erwerbsunfähigkeit und zum vorzeitigen Tod [13]. Prognostisch wird die COPD bis zum Jahr 2020 von Rang 12 (1990) auf Rang 5 der weltweit häufigsten Erkrankungen aufsteigen [97]. Bezugnehmend auf Schätzungen der WHO war die COPD im Jahr 2016 global die dritthäufigste Todesursache [184a]. Die Erkrankung verursacht hohe Gesundheitskosten. Hierzu zeigt eine retrospektive Studie aus den USA bei COPD-Patienten einen annähernd 1,5-fach erhöhten Recourcenverbrauch gegenüber einer Vergleichsgruppe [3]. Zur Schätzung der Prävalenz wurden einige BOLD (Burden of Obstructive Lung Disease)-Studien durchgeführt. In Anlehnung an die GOLD-Kriterien (ab Stadium II) ergab als Beispiel eine Studie mit Teilnehmern (n=9425) aus 12 unterschiedlichen Orten weltweit eine durchschnittliche Prävalenz von 10,1% (Männer: 11,8%, Frauen: 8,5%) [34].

Gründe für die Prävalenz und Mortalität sind abgesehen von einer Zunahme der Lebenserwartung, ein ansteigender Zigarettenkonsum [34] und eine zunehmende Luftverschmutzung, wodurch unter anderem NO₂ eine bedeutende Rolle zukommt [147b]. Durch die erhebliche Rolle von Expositionen am Arbeitsplatz und der durch schädliche Inhalativa resultierenden vorgezogenen Invalidität ist eine große arbeits- und sozialmedizinische Bedeutung hervorzuheben. Inhalative Schadstoffe und oxidativer Stress haben einen bedeutenden Anteil am Verlauf des Inflammationprozesses der COPD. Warum Individuen unterschiedliche Phänotypen mit verschiedener Ausprägung der pathologischen Veränderungen, etwa unter dem klinischen Bild einer chronischen Bronchitis mit Mukushypersekretion [158a], und entsprechender funktioneller Konsequenz entwickeln, ist noch nicht geklärt. Sowohl eine genetische Prädisposition, als auch genannte erworbene Faktoren scheinen bei der Pathogenese beteiligt zu sein [90, 11]. So entwickeln nur 10-20 % der Raucher eine klinisch signifikante COPD [27, 90, 134]. Bei Rauchern, welche eine Atemwegsinflammation entwickeln, findet sich auch dann eine persistierende Inflammation, wenn das Rauchen eingestellt wird. Dies führt zu dem Konzept, dass eine abnormale inflammatorische Antwort gegenüber toxisch inhalativen Substanzen zur Entwicklung einer COPD bei prädisponierten Patienten führt [90].

Die Exposition gegenüber Schadstoffen aktiviert eine inflammatorische Kaskade im Atemwegsepithel mit zunehmender Genexpression von proinflammatorischen Mediatoren über die Aktivierung von Signaltransduktionswegen [19, 75] und

Transkriptionsfaktoren [19]. Die Folgen sind ein Zustrom von inflammatorischen Zellen und die Produktion einer Reihe von Zytokinen und Chemokinen. Die Interaktion zwischen verschiedenen Zelltypen, residenter und immigrierter Entzündungszellen, gewährleistet normalerweise die Homöostase des Gewebes und auch nach Gewebsschäden die Regulation von Reparationsprozessen. Störungen einer dieser Funktionen, resultierend zum Beispiel in einem Überwiegen der proinflammatorischen Mediatoren im Gegensatz zu antiinflammatorischen Mechanismen, können lokale inflammatorische Reaktionen verstärken. Pathophysiologische Resultate sind strukturelle und funktionelle Veränderungen in der Lunge durch Schädigung des Lungenepithels, oxidative Inaktivierung von Antiproteasen, Mukushypersekretion [101] und darüber hinaus systemische Effekte.

Normalerweise kehrt auch eine Muzinhypersekretion innerhalb von Tagen zu einem basalen Level zurück, da Mukussekretion eine wichtige Komponente des angeborenen Immunsystems ist. Über die chronische Entzündung der Atemwegsschleimhaut kommt es allerdings zu Veränderungen des Epithels unter Einschluss der Muzinproduzierenden epithelialen Komponenten, zu denen neben der Becherzellhyperplasie eine Hypertrophie der submukösen Drüsen zählt [138]. Neben Veränderungen der Anzahl und Aktivität der sekretorischen Zellen zeigen sich Veränderungen in der Mukusbiosynthese und im Fluss des Mukus. Diese quantitativen und qualitativen Veränderungen führen zu vermehrtem Sputum [138], zur abnormalen Bakterienbesiedelung und zur Verlegung der Atemwege mit Beeinträchtigung des Gasaustausches [176].

Die Regulation der Muzinsekretion unterliegt komplexen neuralen, neuroendokrinen und parakrinen Mechanismen. Ein besseres Verständnis über diese noch weitgehend unbekannten zugrunde liegenden Steuerungsmechanismen bei COPD ist notwendig, um effektive Therapeutika, mit dem Ziel einer Eindämmung des Ausmaßes der Erkrankung, einsetzen zu können. Aufgrund von Erkenntnissen aus experimentellen sowie klinischen Studien der vergangenen Jahre wird inflammatorischen Zytokinen eine zentrale Bedeutung im Ablauf der Entzündungsreaktionen zugeschrieben und so stehen diese auch im Fokus von Untersuchungen zur Pathogenese der chronischen Bronchitis. Die enorme Komplexität der Interaktionen erschwert jedoch eine Analyse der Zytokinwirkung [178].

Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit ist die Bedeutung der proinflammatorischen Zytokine, im Speziellen GM-CSF. Zum systematischen Studium essentieller Mechanismen der Pathogenese der chronischen Bronchitis wurde ein Tiermodell gewählt. Die Muzinsekretion wurde an trachealen Organkulturen von SD-Ratten und

F344-Ratten mit Hilfe der Ussing-Kammer-Methode (radioaktive Markierung der Muzine mit ^{35}S) untersucht.

Im Folgenden wird zusätzlich zur Überprüfung des Einflusses von NO_2 (Kurz- und Langzeitexposition) auf die Muzinsekretion auch auf die sekretagoge Wirkung des proinflammatorischen Zytokins GM-CSF eingegangen. Weiterhin werden mögliche Interaktionen zwischen GM-CSF und dem Tachykinin Substanz P untersucht.

4.1 Methodik

Bei der Auswahl eines geeigneten experimentellen Modelles ist besonderes Augenmerk darauf zu richten, dass die COPD zum Teil unterschiedlich ausgeprägte pathologische Veränderungen, zu denen die chronische Bronchitis, die Bronchiolitis und das Emphysem gehören, umfasst. Solche Modelle sollten Kriterien wie Parallelen zu humanen Krankheitsprozessen, Reliabilität und Reproduzierbarkeit erfüllen [122].

Die Diagnose der Erkrankung basiert im klinischen Alltag in erster Linie auf den Symptomen der Sputumproduktion mit chronischem Husten. Zum Studium der Mukussekretion und ihrer Regulation wurden verschiedene *in vitro* und *in vivo* Methoden entwickelt. Zur Pathogenese der COPD existieren valide Tiermodelle [122, 138]. Die meisten der dokumentierten Tests widmen sich der akuten Sekretion. Während zum allergischen Asthma bronchiale eine Vielzahl tierexperimenteller Modelle zum Studium der Pathophysiologie existieren, gibt es wenige Modelle, welche die sekretorische Aktivität der Atemwege im Rahmen einer chronischen Atemwegsinflammation bei der chronischen Bronchitis zum Inhalt haben [83b, 172].

Unsere Arbeitsgruppe untersuchte im Vorfeld Änderungen des Sekretionsprofils nach standardisierter Exposition gegenüber zwei inhalativen Noxen: SO_2 und NO_2 . Dabei handelte es sich, da kein ähnlicher Versuchsaufbau in der Literatur zu recherchieren war, um eine Pilotuntersuchung, zu welcher bestimmte Vorgehensweisen und Methoden entwickelt werden mussten, um eine Problemannäherung zu ermöglichen [174]. Die Veränderungen der Rattenbronchien und -lungen zeigen nach langzeitiger NO_2 -Exposition Charakteristika einer COPD, so dass hiermit ein Tiermodell für die Pathogenese Muzin-sekretorischer Veränderungen bei COPD und auch einiger Charakteristika bei COPD vorliegt.

4.1.1 Methoden zur Erfassung der Mukussekretion

Zur Diagnose, Therapieplanung sowie zum Studium obstruktiver Atemwegserkrankungen wie der COPD werden Analysen von induziertem Sputum herangezogen, hierbei handelt es sich um ein nicht invasives Verfahren. Neben der

Untersuchung von infektiösen Prozessen besteht mit dieser Methode die Möglichkeit, charakteristische inflammatorische Zelltypen zu identifizieren, um Rückschlüsse auf den Inflamationsprozess der Atemwege ziehen zu können [93]. Dabei wird über einen Ultraschallvernebler Salzlösung in steigender Konzentration inhaliert. Dies stellt einen bronchokonstriktischen Stimulus dar [93]. Zusätzlich wird durch den Salzgehalt die dem Lungenepithel im oberen Bronchialtrakt aufliegende Mukusschicht verflüssigt. Sputum kann durch Abhusten, aber auch invasiv durch endotracheales Absaugen gewonnen werden. Aus diesen Proben können sowohl zelluläre Bestandteile für die weitere Differenzierung, als auch lösliche Mediatoren isoliert und charakterisiert werden.

Eine invasive, vielfach in der Klinik angewandte Methode, um zelluläres Material aus der Lunge zu gewinnen, ist die BAL. Nachdem Spülflüssigkeit durch ein eingeführtes Endoskop in das Bronchialsystem eingebracht wurde, kann diese wieder aspiriert und analysiert werden. Wegen der oftmals starken Obstruktion der Atemwege bei COPD-Patienten wird diese Methode jedoch zurückhaltend angewendet, zumal alterierte Sekretionsmuster durch die mechanische Reizung denkbar sind.

Die Endoskopie mit einem flexiblen Bronchoskop erlaubt die Sammlung von Sekreten speziell aus den distalen Atemwegen [138].

Sputum als leicht zugängliches Material enthält neben Mukus eine Reihe von Beimengungen, was bei einer quantifizierenden Analyse einen Störfaktor darstellt. Bei invasiven Gewinnungsmethoden wie der Bronchoskopie können zum Beispiel neben pharmakologischen Komponenten auch mechanische Reize eine Abweichung vom physiologischen Zustand bewirken.

In der Literatur werden einige Methoden erwähnt, welche zur direkten Erfassung der Sekretion an Tiermodellen zur Anwendung kommen [138]. Nachfolgend sollen die Wesentlichen gegenübergestellt werden.

Bei der „Hillocks-Methode“ gelingt unter mikroskopischer Kontrolle die Quantifizierung der Sekretion der submukösen Drüsen der proximalen Trachea [138]. Nach Bedeckung des Epithels mit Tantalstaub kommt es zur Ausbildung von kleinen „Sekretionshügeln“ über den Öffnungen von Ausführungsgängen [52]. Somit ist eine Visualisierung der Sekretionsprodukte möglich.

Das Sammeln von Sekreten der submukösen Drüsen über deren Drüsenöffnung [138] ist mit der Methode „Micropipette sampling“ möglich. Hierbei wird die tracheale Oberfläche mit Paraffinöl bedeckt und die einzelnen Drüsen-Ausführungsgänge durch eine ergänzende Färbung mikroskopisch identifiziert [52].

Mit den beiden zuletzt genannten *in vivo* Techniken studierten Davies *et al.* [52] die Innervation der submukösen Drüsen und die autonome Regulation ihrer Sekretionen.

„Superfused tracheal segments“: Diese *in vivo* Methode wird zur Untersuchung von akuter Atemwegsmukussekretion herangezogen. Zum Beispiel wird die cholinerge neurale Kontrolle der Mukussekretion durch elektrische Stimulation des Vagusnerven untersucht. Antagonisten können dabei getestet werden.

Die in einem Trachealsegment synthetisierten und sezernierten Muzine werden radioaktiv markiert, wobei Marker wie ^{35}S oder ^3H -Glukose zum Einsatz kommen [138]. Anschließend erfolgt zur Auswertung ein Dialyseverfahren. Die sekretorische Quelle ist bei dieser Methode unklar. Werden als Tiermodell Gänse herangezogen, welche keine submukösen Drüsen haben, kann man primär die Sekretionen von Becherzellen untersuchen [138].

In einem Übersichtsartikel zu Tiermodellen bei der COPD finden sich nur wenige zum Studium der Mukushypersekretion [83b], beschrieben sind Meerschweinchen- und Rattenmodelle [38a, 121a].

Ein weiteres Tiermodell zur Untersuchung der Pathogenese der COPD ist das „cigarette smoke“ (CS)-Mausmodell [32a, 40b, 167a].

Luftverschmutzungs-Modelle existieren für Meerschweinchen, Ratten und Mäuse, meist mit Feinstaub, Ozon und Kraftstoffgemischen, um die toxologischen Effekte von Verschmutzung und die assoziierte immunologische Antwort der Lunge zu verstehen [83b].

Organexplantate verschiedener Spezies stellen eine Möglichkeit für *in vitro* Untersuchungen dar.

Humane Organexplantate erlauben durch den in der Regel vorausgegangenen Einfluss auf die physiologischen Prozesse, zum Beispiel durch eine mögliche vorbestehende Krankheit, durch den Exitus letalis und durch mögliche Schäden bei der Organentfernung nur eine eingeschränkte Beurteilbarkeit hinsichtlich der Mukussekretion. Untersuchungen an Organkulturmodellen von Tieren minimieren unkontrollierte pathophysiologische Vorgänge innerhalb der Gewebe.

An der trachealen Organkultur können physiologische und morphometrische Untersuchungen Aussagen über die Mukussekretion mittels histochemischer, immunhistochemischer oder autoradiographischer Markierung des intrazellulär, vesikulär gespeicherten Sekretionsmaterials getroffen werden [133]. Quantitative Aussagen sind mit diesen Methoden allerdings nur eingeschränkt möglich.

Die Bestimmung von Lysozym im Bioassay wird als endogener Marker der Mukussekretion herangezogen [177]. Lysozym wird vorwiegend von serösen Zellen der submukösen Drüsen sezerniert.

Kulturen humaner bronchialer Epithelzellen [71b] oder trachealer Drüsenzellen haben sich als Methode zum Studium der sekretorischen Eigenschaften einzelner sekretorischer Zellrassen etabliert [109].

Untersuchungen an Zellkulturen bieten den Vorteil unbegrenzten Untersuchungsmaterials und einer zellulären Homogenität mit der Gewinnung von spezifischen Erkenntnissen einzelner Zelltypen. Der fehlende physiologische Gewebsverband mit Modifikation der Funktion im intakten Gewebe ist jedoch als nachteilig zu erwähnen.

Die Technik der Isolierung einzelner submuköser Drüsen der Katzentrachea wurde zum Beispiel durch Nagaki *et al.* [121] beschrieben. Neben der gewünschten Separation ohne den Einfluss anderer Gewebekomponenten stellt auch hier die Loslösung aus dem Gewebsverband eine Entfernung zu den physiologischen Verhältnissen dar.

Eine weitere, validierte *in vitro* Methode, welche in der vorliegenden Arbeit zur Anwendung kommt, beinhaltet eine radioaktive Markierung des Mukus [129]. Nachdem das isolierte Organ mit dem radioaktiven Marker inkubiert wurde, erscheint dieser nach Einbau in das Muzinmolekül im Sekretionsprodukt. Dialyseschritte eliminieren die nicht kovalent gebundene Radioaktivität. Eine Quantifizierung erfolgt unter der Annahme, dass die verbliebene Radioaktivität der Menge an sezernierten Mukus entspricht [8].

Zum Studium der Hypersekretion bei der chronischen Bronchitis wurde in der vorliegenden Arbeit ein Organkulturmodell gewählt. Die Erfassung der Muzinsekretion wurde an Trachealexplantaten zweier Rattenspezies mit der modifizierten Ussing-Kammer-Technik durchgeführt. Hierbei erfolgte die radioaktive Markierung der Muzinmoleküle mit ^{35}S zur Quantifizierung der Sekretion trachealer submuköser Drüsen.

Da keine exakten Untersuchungen an der Spezies Ratte in der Literatur existieren, wurde mit Hilfe von Pilotuntersuchungen unserer Arbeitsgruppe eine erste Annäherung ermöglicht, um schließlich ein valides Tiermodell, welches sich mit einer Muzinanalyse unter standardisierten inhalativen Expositionsbedingungen beschäftigt, zu entwickeln [174].

4.1.2 Einsatz der modifizierten Ussing-Kammer-Technik unter Verwendung von ^{35}S als radioaktiven Marker

In Doppelmarkierungsstudien gelang im Vorfeld in unserer Arbeitsgruppe die Validierung der Ussing-Kammer Methode unter Verwendung von ^{35}S als eingesetztem Tracer. Zur Beurteilung der Mukussekretion erwies sich ^{35}S hierbei als ebenso gut geeignet wie ^3H -Fucose und ^3H -Glucosamin [33]. ^{35}S hat jedoch unter den Markern den besonderen Vorteil, dass Sulfat nach Anknüpfung an endständige Kohlenhydratgruppen keiner weiteren Metabolisierung unterliegt (31, 174).

Die Ussing-Kammer-Methode setzt eine intakte epitheliale Barriere voraus, damit eine freie Diffusion des Markers nicht möglich ist. Zur Prüfung einer Leckage ließ sich durch den Einsatz des Markers Phenolrot sicherstellen, dass die Trachealexplantate keine Durchlässigkeit für niedermolekulare Substanzen aufweisen [174].

Über den Nachweis einer ausbleibenden signifikanten Zunahme der Aktivitäten zweier eingesetzter zytoplasmatischer Enzyme, der Glutamat-Oxalacetat-Transaminase und der Lactat-Dehydrogenase, konnten Artefakte durch Zellschädigung, auch nach NO_2 -Exposition, ausgeschlossen werden [174].

Durch autoradiographische Untersuchungen mit $\text{Na}_2^{35}\text{SO}_4$ konnte als Ursprung der radioaktiv markierten Makromoleküle der submuköse Drüsenapparat identifiziert werden [174]. In der Literatur wird ^{35}S als relativ spezifisch für die Sekretion submuköser Drüsen der Atemwege bei einigen Spezies wie Katzen, Frettchen und Menschen angegeben [50, 66, 8].

4.1.3 Charakterisierung von Muzin-Glykoproteinen

Makromoleküle der Sekretionsprodukte können neben Muzin-Glykoproteinen auch andere Glycokonjugate wie Proteoglycane und Lipide darstellen [89]. Um die von der Trachea sezernierten Makromoleküle genauer charakterisieren und von anderen Makromolekülen abgrenzen zu können, wurden folgende Untersuchungen im Vorfeld von unserer Arbeitsgruppe vorgenommen.

In Übereinstimmung mit der Literatur ergab sich in bei quantitativen Bestimmungen ein geschätztes Verhältnis Protein / Kohlenhydrat von 20:80 bei nativen Tieren [174].

Zur Einschätzung des Molekulargewichtes der von der Trachea sezernierten Makromoleküle wurde eine Nachweismethode zur Auftrennung der Makromoleküle entsprechend ihrer Molmasse gewählt. Zunächst wurde eine Gelpermeationschromographie HPLC durchgeführt und eine Trennung über eine Kieselgelmatrix (TSK G 2000 SW) mit hohem Druck vorgenommen, wobei

niedermolekulare Moleküle mit einem M von ca. 20.000 Da detektiert wurden. Anschließend wurde eine Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC) über ein „großmaschiges“ Gelsieb mit niedrigerem Druck gewählt, wobei die detektierten Makromoleküle ein M von ca. 900.000 Da zeigten [174]. Durch den zuerst gewählten hohen Trenndruck bei zusätzlich zu „kleinmaschiger“ Gelmatrix konnte eine Zerstörung der Makromoleküle angenommen werden, so dass die detektierten Molekülgrößen nur Bruchstücke des intakten großen Moleküls darstellten. Die durch die FPLC detektierten Makromoleküle wiesen ein Molekulargewicht auf, welches von der Zuordnung charakteristisch für großmolekulare Muzin-Glykoproteine (154 bis ~ 7.000 kDa) des Mukus ist [141]. Nach radioaktiver Markierung dieser Proben mit ^{35}S ließ sich die Aktivität im Bereich dieser Fraktionen nachweisen, was ebenfalls eine Zuordnung zu den Glykoproteinen untermauert.

Eine Identifikation der Proteoglycane basiert auf einer enzymatischen Degradation und die der Glykoproteine auf einer Resistenz gegenüber Hyaluronidase, Chondroitinase und Heparitinase [89]. Die in der Ussing-Kammer mit ^{35}S radioaktiv markierten Makromoleküle zeigten sich in der FPLC als eine Fraktion, die resistent gegenüber Enzymen (Chondroitinase ABC und Heparitinase) war [174].

Als eine weitere Nachweismethode zur Glykoproteinanalyse bei Atemwegsmuzinen der Ratte wurde eine Auftrennung mittels einer *Sodium-Dodecyl-Sulfate-Polyacrylamide*-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE) mit anschließendem Blotten auf Nitrocellulose durchgeführt. Die Glykoprotein-Detektion wurde mittels Digoxigenin-Markierung und Immundetektion vorgenommen. Hierbei ließen sie sich hinsichtlich der Molekülgröße (über 206000 Da) ebenfalls der Gruppe der Glykoproteine zuordnen. Eine spezifische Detektion endständiger Kohlenhydratresiduen erfolgte mittels Lektinen, wobei Ergebnisse auf das reichliche Vorkommen von endständiger Sialinsäure deuteten [174].

4.1.4 Auswahl des Rattentrachea-Organ-Kulturmodells im Speziesvergleich

Die Organkultur der Rattentrachea von F344-Ratten und SD-Ratten stellt in der vorliegenden Arbeit das Modell dar, mit dem unter Verwendung der Ussing-Kammer-Methode die Sekretion trachealer submuköser Drüsen quantifiziert wird. Durch den Erhalt sämtlicher anatomischer Strukturen der Trachea in ihrer Komplexität kommt man dem Wunsch der Übertragbarkeit zu den Verhältnissen *in situ* sehr nahe. Neben einer Quantifizierung der Basalsekretion kann mit diesem Modell zusätzlich eine stimulierte Sekretion erfasst werden.

Sekretionsorte für Muzine der Trachea sind im Wesentlichen die submukösen Drüsen und die Becherzellen [181], wobei die submukösen Drüsen den überwiegenden Anteil übernehmen [82]. Die Verteilung und Ausprägung ist hierbei zwischen den Spezies verschieden. In den großen Atemwegen ist beim Menschen das Verhältnis der Sekretionen von submukösen Drüsen zu Becherzellen etwa 40:1 [140]. Teils vergleichende Untersuchungen existieren hierzu bei Ratten, Mäusen, Meerschweinchen, Hamstern und Kaninchen, wobei Unterschiede hinsichtlich der Anzahl, dem Verteilungsmuster und der Dichte aufgezeigt wurden [181]. Hierbei konnten bei Kaninchen [185] und Gänsen [133] keine, bei Hamstern wenige [185] und bei Mäusen nahezu keine submukösen Drüsen nachgewiesen werden [181]. Bei Mäusen fanden sich diese ausschließlich in der Trachea [148]. Bei Ratten zeigten sich die submukösen Drüsen vor allem im proximalen Teil der Trachea [181, 185]. Trotz der Unterschiede zwischen den Spezies lässt sich allgemein feststellen, dass die Anzahl der submukösen Drüsen bei großen Säugetieren, wie dem Menschen, stärker ausgeprägt ist, als bei Kleinen [185].

Beim Menschen finden sich Becherzellen in allen Anteilen der Atemwege, wobei die Dichte zur Peripherie hin abnimmt [185]. Gesunde Ratten verfügen über deutlich weniger Becherzellen als der Mensch [185]. Dabei finden sich bei Ratten in den kleinen Atemwegen keine Becherzellen und in den großen Atemwegen eine geringe Dichte [185]. In unserer Arbeitsgruppe erfolgten Studien zur Untersuchung der Muzinproduzierenden Strukturen, welche ergaben, dass Becherzellen im Oberflächenepithel der nativen SD-Ratten nur in geringer Anzahl vorhanden sind [174]. Passend hierzu findet man in der Literatur, dass bei spezifisch pathogenfreien SD-Ratten fast keine Becherzellen nachgewiesen wurden [79]. Erst bei einer Exposition gegenüber sehr hohen NO₂-Konzentrationen (ab 30 ppm) ließ sich eine Zunahme der Becherzellen in unserer Arbeitsgruppe nachweisen, wobei der Schwellenwert zwischen 20 und 30 ppm vermutet wird [174].

Die Untersuchungen zur Muzinsekretion wurden in der vorliegenden Arbeit auch im Speziesvergleich (SD-Ratten und F344-Ratten) vorgenommen. In der Literatur finden sich Ergebnisse von Muzin-Untersuchungen zweier Stämme, den Brown-Norway (BN)-Ratten und den F344-Ratten, welche auf einen quantitativen Unterschied hinweisen [124]. Demzufolge und auf Grund der im nachfolgenden Absatz erwähnten Unterschiede zwischen den Spezies, war ein quantitativer Unterschied in der Muzinsekretion auch für unsere Versuche zu erwarten.

Vergleichende Untersuchungen zu verschiedenen Ratten-Stämmen ergaben keine Unterschiede im histologischen Aufbau der Trachea, aber in der Verteilung der

submukösen Drüsen [124]. BN-Ratten zeigten eine höhere Anzahl und bessere Entwicklung der submukösen Drüsen im Vergleich zu F344-Stämmen. Die submukösen Drüsen der F344-Ratten sind im proximalen Bereich der Trachea ebenfalls vorrangig vertreten, aber im mittleren nur noch mäßig und im distalen Bereich so gut wie abwesend [124]. Auch in unserer Arbeitsgruppe wurden die proximalen Trachealabschnitte im Hinblick auf die Verteilung der submukösen Drüsen bei SD-Ratten untersucht. Submuköse Drüsen der SD-Ratten finden sich im Bereich der gesamten Trachea [181] distalwärts abnehmend zwischen den Knorpelringen, vor allem in der ventralen Mittellinie, eingebettet [173].

Die tracheale Organkultur der Spezies Ratte kam bislang häufig zum Studium neurohumoraler Kontrollmechanismen der Mukussekretion zum Einsatz [181]. Untersuchungen zur quantitativen Sekretionsanalyse finden sich kaum in der Literatur. Hierbei stellt sich die Frage, welchen Anteil an der Muzinproduktion die Becherzellen des Oberflächenepithels beziehungsweise die submukösen Drüsen haben. Untersuchungen an SD-Ratten in unserer Arbeitsgruppe ergaben, dass die submukösen Drüsen bei Schadstoff-exponierten Tieren Hauptproduzenten und bei nicht-exponierten Tieren durch den fehlenden Nachweis von Becherzellen möglicherweise alleinige Produzenten sind [174].

4.1.5 Einsatz von NO₂ sowie dessen Einfluss auf die tracheobronchiale Muzinsekretion

Unter den ätiologischen Faktoren in der Genese der chronischen Bronchitis spielt bei Menschen das Zigarettenrauchen mit seiner Fülle von inhalativen Noxen eine Hauptrolle [105] und wurde in vielen Tiermodellen eingesetzt. Dazu gehören vor allem die Maus „Smoking mouse models“, die Ratte und das Meerschweinchen [185]. Nachteil für *in vivo* Modelle mit Zigarettenrauch ist, dass bis zur Entstehung von Lungenläsionen eine mehrmonatige Latenzzeit berücksichtigt werden muss [74]. NO₂ gilt als eine der reaktivsten Komponenten des Tabakrauches. Zusätzlich gehört NO₂ neben O₃ und SO₂ zu den wichtigsten Noxen in der freien Umwelt. Belastungen durch chemisch-irritativ oder toxisch wirkende Schadstoffe nehmen stetig zu und spielen im urbanen Bereich, in Innenräumen und an Arbeitsplätzen eine zunehmende Rolle. Hier wird eine sozial- und arbeitsmedizinische Relevanz deutlich.

NO₂ erzeugt eine Vielfalt von expositions-induzierten pathophysiologischen Änderungen innerhalb der Lunge [164]. Eine Relevanz bezüglich humaner Atemwegs- und Lungenerkrankungen konnte in zahlreichen Studien untersucht und belegt werden [147b]. Eine kurzfristige inhalative Exposition gegenüber NO₂ verursacht dosisabhängige Schäden wie Epithelschäden, Änderungen der Permeabilität der

Atemwege und der Induktion einer inflammatorischen Antwort. Eine Langzeitexposition führt zu biochemischen und mikroanatomischen Veränderungen der Atemwege, welche zur Pathogenese chronischer Lungenerkrankungen beitragen [164].

Kein Modell reproduziert exakt die Veränderungen, welche bei Menschen gesehen werden, aber eine Induktion durch inhalative Schadstoffe kommt dem am Nächsten. Aufgrund der Bedeutung als Umweltnoxen und Bestandteil des Tabakrauches wird NO_2 häufig im Rahmen vieler COPD-Tiermodelle eingesetzt. Besonders das Tiermodell der Ratte hat sich als geeignet für Untersuchungen mit *in vivo* Exposition von Reizgasen wie NO_2 erwiesen [64]. In Analogie zur humanen COPD mit einer akuten Exacerbation oder einer chronischen Inflammation, bietet diese Methode die Möglichkeit, in Abhängigkeit der Expositionsdauer Stadien der Entwicklung einer chronischen Bronchitis mit entsprechender Muzinsekretion zu studieren.

4.1.6 Stickstoffdioxid-Konzentration und Expositionsdauer

In der 22. BImSchV (Bundes-Immissionsschutzverordnung) sind für NO_2 Grenzwerte zum Schutz der menschlichen Gesundheit angegeben. Sie sind in einer Übergangszeit bis 2010 mit Toleranzmargen (Grenzwert plus Toleranzmarge, NO_2 1 ppm \approx 2050 $\mu\text{g}/\text{m}^3$) versehen, die jährlich abgesenkt werden. Der ab 2010 einzuhaltende über eine volle Stunde gemittelte Immissionsgrenzwert für NO_2 beträgt 200 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ mit 18 zulässigen Überschreitungen im Jahr und der über ein Kalenderjahr gemittelte Immissionsgrenzwert für NO_2 beträgt 40 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ [191]. Der MAK-Wert (Maximale Arbeitsplatz-Konzentration) für NO_2 beträgt 950 $\mu\text{g}/\text{m}^3$.

Im Positionspapier der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin e.V. von 2018 sind im Fall für NO_2 die in Deutschland geltenden Grenzwerte der EU, die deckungsgleich mit denen der WHO [184d] sind, wie folgt angegeben: 40 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ Jahresmittelwert und 200 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ als 1-Stunden Maximum [52a, 60a].

Außenluftbelastungen beinhalten große zeitliche und lokale Unterschiede, abhängig von der Verkehrsdichte und der Hintergrundbelastung von 0,4 bis zu 9,4 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ (Ballungsgebiete: 20 bis 90 $\mu\text{g}/\text{m}^3$, 1 Std. 75-1015 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ (rush hour) [68]. Innenraumbelastungen sind abhängig von der Belüftung, der Energiequelle und den Rauchgewohnheiten. Hier kommt es zu Belastungen von bis 200 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ über mehrere Tage bei 1-Std.-Werten bis zu 2000 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ und höher [68].

Kurzfristige NO_2 -Spitzen, aber auch langfristige Expositionen in niedrigen Konzentrationsbereichen bewirken eine Vielzahl biochemischer, struktureller und funktioneller Veränderungen, wobei Studien über NO_2 -Exposition inkonsistente Effekte

auf die Lungenfunktion demonstrierten. Literaturangaben über untersuchte Effekte von NO₂ schwanken zwischen Konzentrationen unter 1 ppm bis weit über 30 ppm und Expositionszeiten zwischen Stunden und mehreren Monaten. Mäuse (6 Wochen / intermittierende Exposition) zeigten bereits bei 0,34 ppm NO₂ histopathologische Veränderungen der Lunge [149]. Inhalationsstudien an Ratten zeigten nach 27-monatiger Exposition gegenüber 0,4 ppm NO₂ histopathologische Veränderungen der Lunge, wobei erste Veränderungen schon nach 18 Monaten zu verzeichnen waren [92]. Bei einer Exposition gegenüber 0,04 ppm NO₂ konnten keine signifikanten Veränderungen nachgewiesen werden [92]. Im höheren Konzentrationsbereich findet man Aufzeichnungen darüber, dass bei einer Exposition gegenüber 30 ppm 8 Stunden/Tag, über 5 Tage/Woche über 6 Wochen von Ratten, Meerschweinchen, Kaninchen, Hunden und Affen im Ergebnis die Hälfte der Meerschweinchen in den ersten beiden Wochen und ein Drittel der Affen in den ersten 30 Tagen verstarben [25].

Die Wahl der Konzentration der Stickstoffdioxidexposition bei 10 ppm NO₂ in dieser Arbeit begründete sich auf Voruntersuchungen in unserer Arbeitsgruppe zur Klärung der Frage, inwieweit die tracheale Muzinsekretion und die epitheliale Proliferation der Atemwege durch die NO₂-Exposition beeinflusst werden [5, 174].

Zum Vergleich der Auswirkungen inhalativer Expositionen gegenüber steigenden Konzentrationen von NO₂ wurden in unserer Arbeitsgruppe mit standardisierter Methodik männliche SD-Ratten jeweils gegenüber 1, 5, 10, 20 und 30 ppm NO₂ für einen Zeitraum von 3 bzw. 25 Tagen exponiert [5, 174]. Dabei erfolgte die radioaktive Markierung der Muzine mit ³⁵S. Beim Vergleich der verschiedenen NO₂-Konzentrationen bis 20 ppm NO₂ untereinander sah man sowohl über einen Zeitraum von 3, als auch von 25 Tagen eine konzentrationsabhängige Zunahme der basalen und mit ACh-stimulierten Muzinsekretion [174, 5].

In der Kurzzeitexposition zeigten 5 ppm eine signifikant niedrigere sekretorische Aktivität, sowohl bei Basal-, als auch bei ACh-stimulierter Sekretion [5]. Nach 3 Tagen mit 30 ppm sah man ebenfalls eine signifikante Abnahme der basalen Sekretion [174]. Ähnliche Ergebnisse erbrachten auch 10 ppm und 20 ppm bei den basalen Sekretionsraten [5]. Im Hinblick auf die basale Sekretion waren bei 3-tägiger Exposition die Differenzen zwischen 5 ppm und 10 ppm signifikant [174]. Die ACh-stimulierte Sekretion fiel nach 3-tägiger Exposition in der 10 ppm-Gruppe nicht signifikant niedriger aus und in der 20 ppm-Gruppe war die Sekretionsrate etwa gleich hoch zur Kontrollgruppe [5]. Bei der stimulierten Sekretion fand sich zwischen 5 und 10 ppm eine Tendenz, zwischen 10 und 20 ppm eine signifikante Differenz [174].

Im Rahmen der Langzeitexposition erbrachte 5 ppm keine wesentlichen Sekretionsunterschiede in der basalen und ACh-stimulierten Schleimproduktion im Vergleich zur Kontrollgruppe. 10 ppm und 20 ppm zeigten bei der basalen Sekretionsrate hochsignifikante Ergebnisse [5]. Für die ACh-stimulierte Sekretion ergaben sich bei 20 ppm signifikante Ergebnisse [5]. Bei 25-tägiger Exposition waren die Unterschiede zwischen 1, 5 und 10 ppm signifikant und zwischen 10 und 20 ppm hochsignifikant [174]. Insgesamt lag die Gesamtsekretion bei 25-tägiger Exposition höher als bei 3-tägiger [174]. Allerdings beobachtete man bei der 30 ppm-Gruppe bezüglich der stimulierten Sekretion andererseits eine hochsignifikante Abnahme der sekretorischen Aktivität verglichen mit der 20 ppm-Gruppe [174]. Die Exposition von 1 ppm für 25 Tage führte, genauso wie 30 ppm, zur signifikanten Suppression der sekretorischen Aktivität [174].

Während bei den SD-Ratten die Kontrolltiere und die gegenüber 5 bzw. 10 ppm exponierten Ratten im Mittel über 30 Gramm innerhalb von 25 Tagen zunahmen, stagnierte das Gewicht jener Tiere, die gegenüber 20 ppm exponiert worden waren [5].

Zur Frage der inhalativ induzierten epithelialen Proliferation wurde die Zahl der argyrophilen Nucleolus-organisierenden Regionen (AgNOR) in verschiedenen Regionen des Bronchialsystems bestimmt. Es wurden topographisch unterschiedliche Verteilungsmuster der AgNOR-Zahl als Maß für Zellproliferation nachgewiesen. Nach NO₂-Exposition zeigten die Befunde, dass die Noxe in niedrigen Konzentrationen zunächst eine Schädigung des Epithels der peripheren Atemwege verursacht. So beobachteten Barth *et al.* [16a] nach 5 ppm NO₂ fast keine Veränderung der AgNOR-Zahl im Epithel der Hauptbronchien. 20 ppm NO₂ vermochten signifikante AgNOR-Anstiege sowohl im Epithel der terminalen Bronchiolen, als auch der großen Atemwege zu bewirken [16a]. Auch bei zunehmender Expositionszeit waren Schädigungsmuster in Richtung der zentralen Atemwege erkennbar.

Bereits bei Dosen < 4 ppm NO₂ ließ sich eine signifikante Erhöhung der Proliferation des Atemwegsepithels erkennen [170].

Bei 3-tägiger Exposition gegenüber 5, 10 und 20 ppm NO₂ sieht man im Oberflächenepithel, in den Ausführungsgängen der submukösen Drüsen und im Azinusepithel mit den zunehmenden NO₂-Konzentrationen einen stetigen Anstieg der AgNOR-Zahl, teilweise jedoch mit unterschiedlicher Signifikanz [174]. Im Gegensatz zum Oberflächenepithel beobachtete man bei 25-tägiger Exposition gegenüber 5, 10 und 20 ppm NO₂ im Bereich der höheren Konzentrationen in den Ausführungsgänge der submukösen Drüsen und im Azinusepithel teilweise keinen Zuwachs oder sogar eine geringe Abnahme der AgNOR-Zahl [174].

Bei morphologischen Studien zeigten sich lichtmikroskopisch folgende qualitative Unterschiede. Ab dem Bereich von etwa 4-5 ppm NO₂ ließen sich beginnende Veränderungen nachweisen [170]. Nach 3-tägiger Exposition mit 5 und 10 ppm NO₂ waren histomorphologische Veränderungen vorwiegend in den zentroazinären Abschnitten der Lunge ausgeprägt, in der Expositionsgruppe 5 ppm jedoch gering [170]. Nach 3-tägiger Exposition mit 20 ppm NO₂ stellten sich bereits makroskopisch deutliche Veränderungen dar [170].

In der Langzeitexposition zeigten sich bei 5 ppm NO₂ im Vergleich zu Kontrolltieren nur sehr geringe und bei 20 ppm NO₂ deutliche morphologische Veränderungen [170].

Zusätzlich konnten bei morphologischen Studien mittels der Lektin-Histochemie die Muzin-produzierenden epithelialen Strukturen sowie deren Verteilung innerhalb der Trachea untersucht werden [174]. Hierbei wurde lichtmikroskopisch bei Stickstoffdioxid (3 und 25 Tage) der „Schwellenwert“ für die Zunahme der Becherzellen zwischen 20 (deutlich) und 30 (ausgeprägt) ppm vermutet [174]. Bei nativen pathogenfreien Tieren ist die Zahl von Becherzellen sehr niedrig bis fehlend [79].

Zusammenfassend zeigte die NO₂-Exposition gegenüber der Ratte, in Analogie zur COPD beim Menschen, biochemische und morphologische Veränderungen in den Atemwegen mit bronchialer Epithelproliferation, Zeichen der Inflammation und Muzinhyperssekretion. Beim Vergleich der Gesamtsekretionsprofile zwischen NO₂ und SO₂, fiel eine signifikant höhere sekretorische Aktivität aller SO₂-exponierten Tracheen gegenüber den NO₂-exponierten auf [174]. Einen qualitativen Unterschied konnte man aber nicht nachweisen. Bei beiden Noxen zeigten sich charakteristische Schädigungsmuster im Rahmen morphologischer Studien [174].

Zur Frage der durch NO₂-Exposition induzierten Proliferation wurde die AgNOR-Zahl in den Bereichen von trachealem Oberflächen-Epithel, Drüsenausführungsgängen und Acini bestimmt. Es wurde eine proliferative Reaktion auf NO₂ bevorzugt in den terminalen Atemwegen und im bronchoalveolären Übergang beobachtet, was am ehesten durch die geringe Wasserlöslichkeit von NO₂ bedingt ist [174]. Aus diesem Grund kann das Reizgas NO₂ relativ weit in die Lunge vordringen und als ungesättigtes Radikal die Schleimhäute der Atemwege angreifen. Auch in der Literatur werden als Schwerpunkt der Schädigung die terminalen Atemwege genannt [61].

Morphologischen Daten zu Folge liegt die Grenze der Expositions-dosis bei etwa 4-5 ppm NO₂, Proliferationsanalysen sprechen für geringere Dosen.

Die Exposition von 1 ppm für 25 Tage führte zu einer signifikanten Suppression der sekretorischen Aktivität [174].

5 ppm führte unter Kurzzeitexposition zu einer signifikant niedrigen sekretorischen Aktivität, unter Langzeitexposition konnten keine wesentlichen Sekretionsunterschiede

in der basalen und ACh-stimulierten Schleimproduktion im Vergleich zur Kontrollgruppe gesehen werden [30]. Proliferationsstudien zur topologischen Beurteilung ergaben nach 5 ppm NO₂ fast keine Veränderung der AgNOR-Zahl (Maß für Zellproliferation) im Epithel der Hauptbronchien [16a].

Im Vergleich der 3- und 25-tägigen Exposition gegenüber 20 ppm NO₂ konnten keine signifikanten Sekretionsunterschiede der Tracheen von SD-Ratten nach Stimulation durch ACh nachgewiesen werden [30]. Hier werden Adaptationsprozesse vermutet, auch wenn die Dosis 20 ppm sich noch deutlich unter der Letalitätsgrenze befindet. Zusätzlich deuteten lichtmikroskopische Untersuchungen mittels Lektin-Histochemie bei NO₂ (3 und 25 Tage) ab einer Konzentration von 20 ppm auf eine Zunahme der Becherzellen hin [174]. NO₂-Expositionen ab 30 ppm führten wieder zur signifikanten Suppression der sekretorischen Aktivität. Zudem wurde diese Konzentration auch nur noch von wenigen Tieren toleriert und noch höhere Konzentrationen waren schon nach wenigen Stunden letal, so dass solche Expositionen nicht möglich waren [174]. Mit steigender Expositionskonzentration kam es zu einer zunehmenden Alteration der zentralen Atemwege [16a, 174], darüber hinaus waren bei zunehmender Expositionszeit ebenfalls Schädigungen der großen Atemwege erkennbar.

Höhere Konzentrationen (ab 20 ppm NO₂) führten neben einer vermehrten Schleimsekretion auch zu einer Beeinträchtigung der Gewichtsentwicklung, was systemische Effekte vermuten lässt [5].

Eine modulierende Wirkung auf die Muzinsekretion durch NO₂-Exposition an der Rattentrachea ist aufgrund dieser Daten evident. Um die Einflüsse auf die Muzinsekretion zu untersuchen, wurden SD-Ratten und F344-Ratten mit standardisierter Methodik gegenüber 10 ppm NO₂ für einen Zeitraum von regelhaft 1, 3, 20 Tagen und darüber hinaus vereinzelt 2 und 28 Tagen exponiert. Dabei sollten gewählte Expositionsdauer und Konzentrationen einerseits Werte aus dem Bereich der täglichen urbanen und Arbeitsplatz-Bedingungen berücksichtigen. Andererseits war ein weiteres Kriterium, eine biologische Schadstoffwirkung auf die trachealen Schleimdrüsen und ihrer Sekrete erkennbar zu machen, ohne die Letalitätsgrenze zu erreichen.

4.1.7 Bestimmung der Basalsekretion (Äquilibrierungszeit)

Das Nährmedium, welches ³⁵S enthält, tritt in der Ussing-Kammer mit der submukösen Seite der Trachea in Kontakt. Nach Inkorporation des Radionuklids in Drüsenzellen mit dem Einbau in die Mukusmakromoleküle erscheint ³⁵S im Sekretionsprodukt auf der mukösen Seite. Die Äquilibrierungszeit ist die Zeitspanne von der Applikation des Markers bis zum Erreichen eines steady state der Sekretion radioaktiv markierter

Makromoleküle im Sinne einer Basalsekretion. Diese variiert von Spezies zu Spezies und von Gewebe zu Gewebe. Eine Markierung der Basalsekretion in der Hundetrachea durch ^{35}S wurde nach 40 Minuten angegeben [78] und beim Frettchen nach 2 Stunden [31]. Die Aquilibrierungszeit benötigt in dickeren Geweben einen längeren Zeitraum [31].

Bei der Rattentrachea wurde in Vorversuchen unserer Arbeitsgruppe in 15-Minutenintervallen eine Verlaufsmessung der Sekretionsraten von ^{35}S -markierten Makromolekülen an nichtstimulierten Tracheen erfasst. Die Sekretion von ^{35}S -markierten Makromolekülen zeigte sich ab der Minute 120 konstant. Man konnte daraus schließen, dass bei der Rattentrachea zu diesem Zeitpunkt eine Sättigung der sezernierenden Zellen und eine Markierung der sulfatierbaren Glykoproteine erfolgt ist [108]. Der Marker wurde dabei bei deren Sulfatierung kontinuierlich in die Muzinmoleküle eingebaut. Sulfat unterliegt keiner weiteren Metabolisierung [31] und die Menge an kovalent gebundenem radioaktivem Sulfat kann als direktes Maß für die Muzinsekretion gelten [32, 31].

4.1.8 Mehrfachstimulation der Muzinsekretion an einer Trachea

Die erste Stimulation mit einer Testsubstanz erfolgte ab der dritten Stunde, nachdem nach der Aquilibrierungszeit noch 4 Leersammlungen (Basalsekretion) im 15 Minuten-Abstand abgenommen wurden. An jeder Trachea wurden im Rahmen der Arbeit Stimulationen mit mehreren Substanzen vorgenommen. Hier gilt es, die Möglichkeit der Verfälschung der Ergebnisse durch gegenseitige Beeinflussung der Substanzwirkungen zu bedenken.

Vorversuche unserer Arbeitsgruppe bezüglich der Regenerationsfähigkeit der Organkultur zeigten, dass bei wiederholter Applikation einer Testsubstanz gleiche Ergebnisse vorlagen, wenn der Zeitraum zwischen den Stimulationen 30 Minuten betrug. Zwischen den Stimulationen erfolgten Leersammlungen mit reinem Medium. In dieser Zeit findet eine Erholung statt und die Sekretionsrate kehrt sowohl beim wiederholten Einsatz der gleichen, als auch beim Einsatz unterschiedlicher Substanzen im Verlauf stets auf ein Basalniveau zurück. Eine Stimulation in diesem Abstand sollte somit Wirkungsminderungen oder Wechselwirkungen ausschließen.

4.1.9 Aufbereitung der Proben durch die Dialyse

Die Dialyse als Trennungsvorgang kommt häufig zum Einsatz [154, 132].

Nach Probensammlung erfolgte die Aufbereitung der Proben, um die ^{35}S -markierten Glykokonjugate von freiem oder ionisch gebundenem ^{35}S zu trennen. In unserer

Arbeitsgruppe wurde im Vorfeld untersucht, wie viele Dialysegänge zur Entfernung von ungebundenem oder ionisch gebundenem ^{35}S aus den Proben benötigt werden. Zur Trennung wurden Dialyseschläuche mit einer Undurchlässigkeit für Moleküle größer 12000-14000 Da verwendet, um die Fraktion des radioaktiven Markers, der nicht in die Muzine (900000 Da) eingebaut wurde, zu eliminieren. Nach spätestens acht Wechslen mit einem Abstand von mindestens drei Stunden entsprach die Zählrate bei der Analyse der Proben des Dialysewassers der von destilliertem Wasser, diese beträgt etwa 35-40 cpm [58]. Es war also davon auszugehen, dass sich nach acht Wechslen kein ungebundener ^{35}S mehr im Dialysewasser befand. Die Zählrate der markierten Glykoproteine einer 7 ml-Sammlung nach Eliminierung des freien ^{35}S durch die Dialyse betrug je nach vorhergehender Stimulation zwischen etwa 80-600 cpm und die Summe aus den einzelnen Dialyseflüssigkeiten nach abgeschlossener Dialyse pro 7 ml-Probe ungefähr 13600 bis 70000 cpm [108]. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde die Dialyse als effizientes Verfahren zur Aufbereitung unserer Proben eingesetzt und nach dem achten Wechsel beendet. Die verbleibende Radioaktivität wurde danach im β -Zähler analysiert.

4.2 Ergebnisse der Sekretionsanalyse

4.2.1 Auswirkung von 10 ppm NO_2 in unterschiedlicher Expositionsdauer auf das tracheobronchiale System bei F344-Ratten und SD-Ratten

4.2.1.1 Ergebnisse der Basalsekretion nach NO_2 -Exposition im Speziesvergleich

Über die Wirkung des Stickstoffdioxids am Versuchstier sowie am Menschen liegen vielfältige, teils widersprüchliche Untersuchungen vor. Trotz umfangreicher Untersuchungen sind die Mechanismen, welche nach NO_2 -Exposition auftreten, nicht bis ins Detail verstanden. Ergebnisse zu Untersuchungen zu den Auswirkungen von inhaliertem NO_2 speziell auf die sekretorischen Komponenten der oberen Atemwege sind, im Gegensatz zu den peripheren Atemwegen, in der derzeitigen Literatur kaum verfügbar.

Verschiedene Autoren stellten die Hypothese auf, dass die Exposition gegenüber NO_2 zu einer dosisabhängigen [59] Epithelschädigung führt und dass es über die daraus resultierende Bildung von Mediatoren zur Induktion einer inflammatorischen Antwort kommt [44, 51].

In dieser Arbeit ließen sich sowohl für die F344-Ratten als auch für die SD-Ratten keine signifikante Änderung der basalen sekretorischen Aktivität in allen untersuchten

Expositionszeiten, sowohl im Vergleich untereinander als auch im Vergleich zu den Kontrolltieren, nachweisen.

Allerdings findet sich bei beiden Spezies eine in der Tendenz ähnliche Sekretionsmodulation in Abhängigkeit zur NO₂-Exposition. Es lassen sich unter Kurzzeitexposition bei beiden Spezies ein zunächst ansteigendes Sekretionsniveau unter 1-Tages-Exposition (Fischerratte nativ/ 1d: 36,92 cpm/ 43,09 cpm; SD-Ratte nativ/ 1d: 75,92 cpm/ 145,8 cpm) und dann ein abfallendes Sekretionsniveau unter 3-Tages-Exposition (Fischerratte nativ/ 3d: 36,92 cpm/ 41,75 cpm; SD-Ratte nativ/ 3d: 75,92 cpm/ 124,08 cpm) beobachten. Unter Langzeitexposition von 20 Tagen beobachten wir bei beiden Spezies (Fischerratte 20d: 43,26 cpm; SD-Ratte 20d: 154,27 cpm) wiederum ein ansteigendes Sekretionsniveau. 28 Expositionstage (SD-Ratte: 30,1 cpm), eine Expositionszeit, welche nur von der SD-Ratte toleriert wurde, zeigen eine Abnahme der Sekretion.

In der Literatur wird der initiale Verlust von Antioxidantien in der BAL nach erfolgter akuter Exposition (1,5 h und 6 h) gegenüber NO₂ beschrieben (2 ppm NO₂: 1. Freiwilligengruppe: 1,5 Stunden; 2. Gruppe: 6 h; 3. Gruppe: 24 h) [87]. Sagai *et al.* [147] untersuchten für Studien zu biochemischen Effekten von Stickstoffdioxid männliche Wistar-Ratten, welche für 2 Wochen kontinuierlich gegenüber 10 ppm NO₂ exponiert wurden. Hierbei zeigte sich eine Änderung der Aktivität protektiver antioxidativer Enzyme wie zum Beispiel der Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G6PD). Zunächst kam es zur geringfügigen Reduktion dieser Enzyme am Tag 1, im Verlauf jedoch zu einer signifikanten Zunahme mit dem Erreichen eines maximalen Levels zwischen dem 5. bis 10. Tag, welches bis zum Tag 14 aufrechterhalten wurde [147]. Zudem wurde in den Lungen von Ratten, welche unterschiedlichen NO₂-Konzentrationen (3 bis 15 ppm NO₂) ausgesetzt wurden, eine dosisabhängige Zunahme der Aktivität der Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase nachgewiesen [59]. Ein modifiziertes Model in Elsayed *et al.* [59] interpretiert die morphologische und biochemische pulmonale Antwort auf den toxischen Einfluss von NO₂. Während der initialen Phase der Exposition (innerhalb der ersten 24h, Stadium der Verletzung) kommt es unter anderem zur Abnahme der metabolischen Aktivitäten, um im Anschluss proportional zur Expositions-dosis durch Zunahme ein Plateau (für 48 bis 72 h) zu erreichen [59]. Dieses Stadium (Stadium der Adaptation) ist ebenfalls mit zunehmenden inflammatorischen Prozessen assoziiert, was zu biochemischen Aktivitäten beiträgt [59]. Eine Supprimierung der Muzinsekretion nach 3-tägiger Expositionsdauer wurde ebenfalls bereits in den Vorversuchen unserer Arbeitsgruppe beobachtet [5].

Diese Aussagen und die Ergebnisse in dieser Arbeit lassen vermuten, dass eine Induktion protektiver Enzymsysteme ab etwa dem zweiten Expositionstag als Reaktion auf toxische Einflüsse von NO₂ mit einer vorübergehend rückläufigen Sekretion einhergeht.

Die *in vivo* Exposition von Ratten gegenüber NO₂ induzierte neben einer Lungengewebsinflammation Gefäßveränderungen, Alveolarschäden und die Entwicklung eines Emphysems [64]. Die NO₂-Exposition gegenüber der Ratte führte zu einem vermehrten Nachweis von Neutrophilen [26, 64] und Makrophagen [64], wobei neutrophile Granulozyten sich insbesondere in der Frühphase der Exposition und Makrophagen in der Spätphase der Exposition zeigten. Saetta *et al.* [146] untersuchten die inflammatorischen Zellen in den bronchialen Drüsen von Rauchern. Raucher mit Symptomen einer chronischen Bronchitis zeigten nachweislich eine erhöhte Infiltration von Neutrophilen, Makrophagen sowie einen zunehmenden Anteil von CD8⁺-T-Lymphozyten in den bronchialen Drüsen von Lobärbronchien (n=18, davon 9 mit Raucheranamnese und Mukushypersekretion) [146].

Das proinflammatorische Zytokin GM-CSF [13] etwa führt zur Rekrutierung von Neutrophilen zum Ort der Inflammation und inhibiert deren Apoptose. Eine neutrophile Infiltration des Atemwegsepithels kann vermutlich die Hypersekretion durch direkte Interaktion mit mukusproduzierenden Zellen vermitteln [103, 118]. An dieser Stelle sind die Serinproteasen zu nennen, welche potente Sekretagoga sind [13, 146, 118, 95]. GM-CSF übt somit einen indirekten Einfluss auf die Mukusproduktion über Neutrophile aus.

In Kulturversuchen humaner Bronchialepithelzellen konnte nach NO₂-Exposition die Expression der mRNA von den proinflammatorischen Zytokinen IL-1 β , TNF- α , GM-CSF und IL-8 nachgewiesen werden [53].

Makrophagen dominieren in der Spätphase nach Exposition. Sie sezernieren ebenfalls nach Exposition gegenüber toxischen Inhalativa verschiedene Mediatoren (Leukotriene, Chemokine, Sauerstoffradikale, Zytokine) [13], welchen bei der Modulation der Mukussekretion eine Rolle zugeschrieben wird.

Bei kontinuierlicher Exposition setzen vermutlich Schädigungsmechanismen ein, welche eine zelluläre Hemmung der sekretorischen Aktivität bedingen [174]. Darüber hinaus haben hohe Expositionszeiten und -konzentrationen je nach Spezies eine letale Wirkung. Meist zeigt sich ein hämorrhagisches Lungenödem. Dies wird übereinstimmend auch von anderen Arbeitsgruppen berichtet [59] und lässt sich mit unseren Beobachtungen, dass eine Exposition > 20 ppm bei den F344-Ratten nicht mehr toleriert wurde. Darüber hinaus findet sich in dieser Arbeit bei SD-Ratten nach 28-tägiger Exposition gegenüber 10 ppm NO₂ ein Verlust der sekretorischen Kapazität.

Eine ursprünglich intendierte Exposition auch der Fischerratten über diesen Zeitraum ließ keine auswertbaren Ergebnisse zu.

Bei den Basalsekretionsauswertungen dieser Arbeit zeigen sich im Vergleich zu den Fischerratten signifikant höhere Sekretionsraten sowohl bei den Kontrolltieren als auch bei 1-Tages, 3-Tages und 20-Tages exponierten SD-Ratten gegenüber 10 ppm NO₂.

Bei beiden Spezies zeigen die submukösen Drüsen im proximalen Bereich die größte Dichte, jedoch gibt es auch einen schon erwähnten Unterschied zugunsten der SD-Ratten. Zudem sind die submukösen Drüsen bei F344-Ratten nach distal zunehmend weniger vertreten. Aus diesem Grund war in diesem von uns untersuchten Bereich ein quantitativer Unterschied zu erwarten.

4.2.1.2 Auswirkung von ACh nach NO₂ Exposition im Speziesvergleich

ACh ist klassischer Überträgerstoff an allen präganglionären autonomen und an allen parasympathischen sowie einigen sympathischen postganglionären Nervenfasern. Die Präsenz von cholinergen Rezeptoren auf submukösen Drüsen wurde umfassend in der Einleitung beschrieben. ACh wirkt an zwei Typen von Rezeptoren, die entsprechend ihrer Ansprechbarkeit als nicotinerge Rezeptoren und M-Rezeptoren bezeichnet werden. Die Wirkung von ACh an den M-Rezeptoren ist an G-Proteine gekoppelt.

M₃-Rezeptoren finden sich bei submukösen Drüsen; ihre Aktivierung durch ACh führt zur Schleimsekretion [115].

Die Ausschüttung von ACh wird über M₂-Rezeptoren als Autorezeptoren auf cholinergen präganglionären Nervenendigungen reguliert [115].

M₁-Rezeptoren an parasympathischen Ganglienzellen spielen eine Rolle bei der cholinergen Neurotransmission [115].

ACh wird als Maßstab für eine Maximalantwort des vorgestellten Organkulturmodells angesehen. Eine Stimulation durch ACh setzten wir einerseits als positive Kontrolle der jeweiligen Tracheen auf ihre sekretorische Kapazität und andererseits auch zur Aussage der sekretorischen Aktivität verschiedener Spezies nach Kurz- und Langzeitexposition gegenüber NO₂ ein.

Die vorliegenden Ergebnisse demonstrieren, dass bei beiden Spezies, unter Ausnahme der 28-tägig exponierten SD-Ratte, die Sekretionsrate durch Acetylcholin im Vergleich zur Basalsekretion signifikant gesteigert wird. Hierbei ergibt sich bei folgenden Expositionsgruppen ein signifikant stimulierender Effekt (% der Basalsekretion: Fi_{na}=182,85%; Fi_{1d}=185,57%; Fi_{3d}=255,35%; Fi_{20d}=268,12%; SD_{na}=299,9%; SD_{1d}=324,74%; SD_{3d}=227,2%; SD_{20d}=197,35%).

Im direkten Vergleich der einzelnen Expositionszeiten bei den Fischerratten nimmt die Mukussekretion unter ACh-Stimulation im zeitlichen Verlauf tendenziell zu. Nach 3 Tagen sowie 20 Tagen NO₂-Exposition ergeben sich jeweilig signifikante expositionverstärkende Effekte gegenüber der Nativ-Gruppe.

Der Verlauf des Sekretionsniveaus unter ACh-Stimulation bei der SD-Ratte wird, wie bei den Basalsekretionsraten, von dem Bild einer verminderten Reagibilität des Tracheobronchialsystems bei 3-Tages-exponierten Tieren begleitet. Nach 28 Tagen NO₂-Exposition werden darüber hinaus gegenüber der Nativgruppe und gegenüber der 2-Tages Expositionsgruppe signifikante expositionabschwächende Effekte beobachtet.

Die bei 3-tägiger NO₂-Exposition gegenüber 10 ppm registrierte Abnahme der ACh-induzierten Muzinsekretion bei den SD-Ratten im Vergleich zu Kontrolltieren stimmt mit vorherigen Sekretionsstudien unserer Arbeitsgruppe an SD-Ratten überein [5].

Korrespondierend zu diesen Ergebnissen gibt es Beobachtungen, denen zufolge ACh regulierende Einflüsse im Bereich der Atemwege auch bei entzündlichen Atemwegserkrankungen hat. So wird möglicherweise eine GM-CSF-Freisetzung aus humanen Atemwegs-Epithelzellen über nicotinerge Rezeptoren getriggert [91].

Im Folgenden wird nun das NANC-System betrachtet, dieses zeigt modulierende Effekte auf die cholinerge Regulation der Mukussekretion [140]. Für das Peptid VIP wird von einer co-Existenz mit ACh in cholinergen Nerven berichtet. VIP-Rezeptoren sowie cholinerge Nerven wurden nahe der submukösen Drüsen nachgewiesen [140]. Der NANC-Mediator VIP inhibiert die Mukussekretion und verringert somit das sekretorische Ausmaß nach cholinenger Stimulation [140]. PHI oder PHM, welche mit VIP wiederum co-existieren, zeigen gleichsinnige Einflüsse auf das sekretorische Ergebnis [140, 133]. Ähnlich zu proinflammatorischen Peptiden wird VIP durch Atemwegsenzyme wie die Neutrale Endopeptidase (NEP) degradiert und somit supprimiert [69]. NEP kann durch inhalative Noxen in seiner Funktion beeinträchtigt werden [69]. Im entzündlichen Gebiet wiederum verlieren Peptide dieser Familie, zum Beispiel durch Peptidasen inflammatorischer Zellen, ihre inhibitorischen Effekte mit möglicher Verstärkung der cholinergen Sekretionsstimulanz bei Langzeitexposition.

Der M₂-Rezeptor, welcher in cholinergen Nerven lokalisiert ist, arbeitet normalerweise als ein inhibitorischer Feedback-Mechanismus (Autorezeptor), so dass eine weitere ACh-Sekretion am Nervenende kontrolliert wird. Hier könnte eine mögliche muscarinische Autorezeptordysfunktion durch inflammatorische Prozesse diskutiert werden [140].

Darüber hinaus ist denkbar, dass möglicherweise die Acetylcholinesterase unter den beschriebenen Bedingungen weniger effektiv arbeitet [140].

4.2.2 SP und seine Auswirkung auf die Muzinsekretion im Speziesvergleich

Schädliche Inhalativa können ursächlich an einer „neurogenen Entzündung“ beteiligt sein, welche in einem komplexen Zusammenspiel zwischen den die Atemwege innervierenden Nervenbahnen und der Atemwegsinflammation ihren Anfang nimmt.

Im Rahmen der Untersuchungen spezieller Regulationsmechanismen der Muzinsekretion fokussiert ein Teil dieser Arbeit einen Ausschnitt des NANC-Systems mit der Rolle der „neurogenen Entzündung“, welchem als pathophysiologischem Aspekt eine entscheidende Rolle bei der Genese der Hypersekretion im Rahmen der chronischen Bronchitis zukommt. Dazu wurde der Einfluss des Tachykinins SP, einem proinflammatorischen peptidergen Mediator des exzitatorischen NANC-Systems, auf die Mukussekretion im Speziesvergleich untersucht.

Elektronenmikroskopische Untersuchungen an Katzentracheen ergaben, dass sich SP-immunreaktive Fasern im unmittelbaren Bereich von submukösen Drüsen finden [135].

SP induziert bei mehreren Spezies im unteren Respirationstrakt die Sekretion verschiedener Mukusmarker *in vitro* [133]. Es wird vermutet, dass SP die Mukussekretion über zwei Mechanismen induziert. Licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen der trachealen Sekretion von Frettchen ergaben, dass SP die Degranulation von serösen Zellen submuköser Drüsen induziert [65]. In submukösen Drüsen der Hundetrachea zeigte sich unter SP *in vitro* eine Expulsion radioaktiv markierter Glykokonjugate, wobei die Ausscheidung des Sekretionsproduktes in den Ausführungsgang durch einen möglichen Einfluss auf die myoepitheliale Zellkontraktion erklärt wurde [43]. Parallel zeigte SP bei isolierten submukösen Drüsen der Katzentrachea einen Einfluss auf die Drüsenkontraktion und eine induzierte Sekretion radioaktiv markierter Glykokonjugate [152].

Tachykinine zeigen unterschiedliche Effekte durch verschiedene Affinitäten zu den Tachykinin-Rezeptoren (Neurokinin (NK)₁-, NK₂- und NK₃-Rezeptoren) [69, 133]. Zur Untersuchung der Tachykininwirkung zeigte unsere Arbeitsgruppe an der Rattentrachea eine dosisabhängige Stimulation der Muzinsekretion durch die drei untersuchten Tachykinine SP, NKA und NKB mit folgender Rangordnung: SP > NKA > NKB [171]. Dass SP die Mukussekretion potenter als NKA und NKB induziert, konnten auch andere Autoren zum Beispiel an humanen Bronchien *in vitro* bestätigen [140]. SP ist vor allem für den NK₁-Rezeptor [69] ein potenter Agonist (SP > NKA oder NKB). NK₁-Rezeptoren finden sich unter anderem in submukösen Drüsen [69]. Mit Hilfe von

selektiven Rezeptorantagonisten demonstrierte unsere Arbeitsgruppe, dass die stärksten sekretagogen Effekte der Tachykinine an der Rattentrachea über die NK₁-Rezeptoren vermittelt werden [171]. Dies stimmt auch mit Beobachtungen in der Literatur überein [131].

Über den NK₁-Rezeptor wird unter anderem auch die ACh-Freisetzung an cholinergen Nervenendigungen moduliert und somit die cholinerge Neurotransmission beschleunigt [69].

In der vorliegenden Arbeit können sowohl bei den Kontrolltieren als auch bei den jeweilig unterschiedlich lange exponierten (1d, 3d, 20d) Fischerratten signifikant höhere Sekretionsraten nach SP-Stimulation gezeigt werden (jeweils $p < 0,01$). Bei der SD-Ratte zeigen sich signifikante Werte in der Kontroll- und 3 Tages- Expositions-Gruppe ($p = 0,046$ bzw. $p < 0,01$).

Die Sekretionsantwort unter SP zeigt nach NO₂-Exposition im Vergleich der Expositionsgruppen untereinander und im Vergleich zu den Kontrolltieren bei beiden Spezies keine signifikante Veränderung. Allerdings zeigt sich bei der F344-Ratten-Trachea nach 1-Tages-Exposition die tendenziell höchste, jedoch nicht signifikant abweichende Sekretionsrate (nativ: 130,44 % of basal; 1d: 157,04 % of basal; 3d: 140,03% of basal; 20d: 141,32% of basal). Hingegen findet sich für die SD-Ratte in der Kontrollgruppe die tendenziell höchste, jedoch ebenfalls nicht signifikant abweichende Sekretionsrate (nativ: 234,86 % of basal; 3d: 158,51% of basal; 20d: 126,09% of basal).

In Analogie zu den bereits gezeigten Ergebnissen im Speziesvergleich zeigen die SD-Ratten im Vergleich zu den Fischerratten sowohl bei den Kontrolltieren als auch in allen untersuchten Expositionsgruppen (3d, 20d) ein signifikant höheres Sekretionsniveau unter SP.

Offenbar ist die sekretmodulierende Wirkung dieses Tachykinins auch in Abwesenheit einer NO₂-Exposition vorhanden. In unserem Modell der akuten und chronischen Atemwegsinflammation ist dieser postulierte Effekt ebenso objektivierbar.

Durch NO₂-Inhalation werden frühzeitig sensorische C-Fasern stimuliert, wodurch es zur Freisetzung von Neuropeptiden wie SP kommen kann. So konnte zum Beispiel bei Ratten nach der Exposition gegenüber inhalativen Schadstoffen wie SO₂ SP in erhöhter Konzentration in der Trachea nachgewiesen werden [57]. Daher kann eine Sekretionssteigerung unter NO₂-Exposition angenommen werden, was die beschriebenen Ergebnisse dieser Arbeit untermauern würde.

SP wiederum wird durch die Enkephalinase [140], einer NEP mit Präsenz im Lungengewebe vieler Spezies, abgebaut [140]. Bestätigend potenzieren NEP-

Inhibitoren wie Phosphoramidon die induzierte Mukussekretion durch SP [140]. Durch schädigende Einflüsse auf das Atemwegsepithel durch inhalative Schadstoffe, Sauerstoffradikale und virale Infekte ist eine Verringerung der NEP-Aktivität denkbar [69]. Neben NEP ist ACE (angiotensin converting enzyme) als weitere Peptidase zu nennen [69].

Bei einem Teil der Neuropeptide wird, wie schon erwähnt, auch ein indirekt modulierender Effekt auf die cholinerge Neurotransmission vermutet. SP fördert die cholinerge ACh-Freisetzung [41].

Zudem stimuliert SP die Freisetzung von inflammatorischen Zytokinen wie IL-1, IL-6 und TNF- α durch Monozyten und von IL-8 durch Granulozyten [41]. Diese scheinen darüber hinaus eine eigenständige direkte oder indirekte Rolle bei der Mukushypersekretion zu haben.

Die beschriebenen komplexen pathophysiologischen Zusammenhänge bedingen somit möglicherweise, dass es keine linearen Zuwachsraten der Muzinsekretion einerseits in der NO₂-Exposition und andererseits unter Stimulation von SP gibt.

4.2.3 Einfluss des proinflammatorischen Zytokins GM-CSF auf die Muzinsekretion

Auf Grund von Beobachtungen unserer Arbeitsgruppe zur Wirkung der proinflammatorischen Tachykinine ergab sich der darüber hinaus gehende Ansatz, inwiefern auch proinflammatorische Zytokine Einfluss auf die Regulation der Muzinsekretion haben.

Zytokine sind wichtige multifunktionelle Mediatoren von Zellreaktionen und Zellkommunikation untereinander [86]. Diese wechselseitigen Interaktionen zeigen in proinflammatorischen Prozessen Einfluss auf die muzinbildenden epithelialen Komponenten, wodurch eine Muzinhypersekretion hervorgerufen werden kann. Bei chronisch-inflammatorischen Erkrankungen wie der COPD, welche mit Hypersekretion einhergeht, ist die Balance zwischen pro- und antiinflammatorischen Prozessen zugunsten der Aufrechterhaltung der Inflammation verschoben.

GM-CSF als hämatopoetisches Zytokin und proinflammatorischer Mediator ist ein Schlüsselzytokin bei der Regulation von Inflamationsprozessen.

Unter physiologischen Bedingungen wird GM-CSF in geringer Menge vom Lungenepithel zur Ausdifferenzierung der Alveolarmakrophagen sezerniert [151]. GM-CSF hat einen wesentlichen Einfluss auf das Überleben, die Proliferation und die inflammatorische Aktivität von Makrophagen und Neutrophilen [111, 22]. Indirekte Einflüsse im Hinblick auf die Pathophysiologie der COPD bestehen über residente und

eingewanderte Zellen durch Sekretion von weiteren Mediatoren wie zum Beispiel von weiteren Zytokinen sowie von Proteasen und Chemokinen.

Zur näheren Einordnung dieser pathophysiologischen Mechanismen befasst sich die vorliegende Arbeit daher auch mit der Wirkung des proinflammatorischen Zytokins GM-CSF auf die Muzinsekretion nativer und NO₂-exponierter F344-Ratten.

4.2.3.1 Untersuchung der Wirkung von GM-CSF auf die Muzinsekretion der F344-Ratten-Trachea nativ sowie nach NO₂-Exposition

In der vorliegenden Arbeit konnte am Rattentrachealexplantat mit der modifizierten Ussing-Kammer-Methode die im Folgenden beschriebene Stimulation der Muzinsekretion durch GM-CSF gezeigt werden.

Bei den nativen Fischerratten-Tracheen zeigen sich bei allen untersuchten Konzentrationen von 0,01 bis 1,0 ng/ml GM-CSF keine signifikanten Werte ($p > 0,05$) und somit keine Hinweise auf einen relevanten prosekretorischen Effekt des proinflammatorischen Zytokins.

Bei der 1 Tages-Expositionsgruppe führt GM-CSF ebenfalls in jeder untersuchten Konzentration (0,05 -0,4 ng/ml) weder zu einer Verstärkung noch zu einer Verringerung der Mukussekretion.

Mit zunehmender Expositionszeit erhalten wir einen signifikanten sekretionssteigernden Effekt bei folgenden Konzentrationen: bei der 3-Tages-Expositionsgruppe für 0,1 ng/ml GM-CSF (129,14%) und für 0,4 ng/ml GM-CSF (128,97%) sowie in der 20-Tages-Expositionsgruppe für 0,1 ng/ml (115,38%) und 0,15 ng/ml (121,24%) und 0,2 ng/ml (119,65%) GM-CSF.

Hierbei erhalten wir für die 20-Tages exponierte Fischerrattentrachea für 0,2 ng/ml GM-CSF ein hochsignifikantes Ergebnis ($p < 0,001$) mit einer Sekretionsantwort von 119,65 % der Basalsekretion.

Zusammenfassend stimuliert GM-CSF die Muzinsekretion der Fischer-Rattentrachea dosis- und expositionsabhängig. Der maximale sekretionssteigernde Effekt liegt hier bei 0,2 ng/ml GM-CSF. Somit wirkt GM-CSF an der Rattentrachea unter Langzeit-NO₂-Exposition deutlich sekretagog.

Bei höherer Fallzahl ist ein statistisch nachweisbarer Effekt auch in den übrig verwendeten Konzentrationen denkbar. Bei 0,4 ng/ml GM-CSF ist unter 20-Tages-Exposition keine Signifikanz zu verzeichnen, ein Trend ist jedoch erkennbar.

Die Beobachtung, dass ohne NO₂-Exposition und auch zu Beginn der Exposition ebenfalls keine signifikante sekretagoge Wirkung durch GM-CSF zu verzeichnen ist,

spricht für die Hypothese, dass ein längerfristiges inflammatorisches Geschehen Voraussetzung für diesen Mechanismus ist.

Die mukus-modulierende Wirkung des Zytokins wird durch direkte und indirekte Einflüsse erklärt. Hierbei findet sich ein komplexes Zusammenspiel von inflammatorischen Zellen und Mediatoren auf die Muzin-produzierenden epithelialen Komponenten. GM-CSF hat eine entscheidende Rolle bei der Entstehung der bronchialen Inflammation, was insbesondere hinsichtlich einer bronchialen Hyperreaktivität bei allergischen Atemwegserkrankungen untersucht wurde [123, 37]. Erhöhte Konzentrationen dieses Zytokins konnten, wie erwähnt, ebenfalls bei COPD-Patienten in der BAL, vor allem während der Exacerbation nachgewiesen werden [13].

Inhalative Schadstoffe bewirken bei Alveolarmakrophagen und im Atemwegsepithel über die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren eine Genexpression von Zytokinen wie zum Beispiel TNF- α sowie Chemokinen wie zum Beispiel IL-8 [11]. Eine Freisetzung des proinflammatorischen Zytokins GM-CSF wurde ebenfalls nach Exposition gegenüber inhalativen Schadstoffen beobachtet [123]. So sind Epithelzellen als Reaktion auf die inhalative Noxe NO₂ dazu befähigt, GM-CSF zu synthetisieren [53]. Hohe Expositionskonzentrationen gegenüber NO₂ zeigten eine zunehmende Kumulation von Entzündungszellen, welche ebenfalls direkt oder indirekt über weitere Mediatoren an der GM-CSF-Produktion beteiligt sind.

GM-CSF führt seinerseits zur Ausdifferenzierung von Alveolarmakrophagen. Dabei zeigt es eine chemotaktische Wirkung auf Makrophagen und stimuliert diese zur Produktion weiterer proinflammatorischer Zytokine wie TNF- α und IL-1 β [123] und anderer Mediatoren mit konsekutiver Generierung des „respiratory burst“ mit Schädigung des Lungenepithels. Makrophagen wiederum sezernieren GM-CSF. TNF- α kann ebenfalls über Epithelzellen und T-Lymphozyten die Synthese und Ausschüttung von GM-CSF stimulieren [123].

Die Sekretion „früher Zytokine“ nimmt neben den Chemokinen eine wichtige Rolle bei der Regulation der Neutrophilenakkumulation in der Lunge über die Modulation der Adhäsionsmolekülaktivierung ein [70]. Der Mechanismus der neutrophilen Inflammation bei der COPD ist nicht zuletzt im Hinblick auf die komplexe Interaktion vieler Mediatoren ein noch wenig verstandenes Gebiet.

Ebenfalls erhöht GM-CSF die neutrophile Inflammation, da es nicht nur bei Makrophagen, sondern auch bei neutrophilen Granulozyten [13] einen verlängernden Einfluss auf die Lebensdauer hat. In Neutrophilen induziert GM-CSF die Aktivierung des JAK / STAT-Signaltransduktionswegs (JAK2, STAT3 und STAT5B) [4] und stimuliert die PI3K, welche eine wichtige Rolle in der Signaltransduktion spielt.

Schlussfolgernd wird vermutet, dass GM-CSF an einer Vielzahl von zellulären Schlüsselfunktionen bei den Neutrophilen beteiligt ist.

Neutrophile können, wie auch durch GM-CSF aktivierte Makrophagen, eine Reihe von Mediatoren wie proinflammatorische Zytokine, Proteasen [27, 20] sowie freie Radikale [62, 101] produzieren, welche die Gewebsinflammation und pulmonale Schäden fördern.

Vor allem Raucher mit einer COPD zeigen im Vergleich zu Rauchern ohne Erkrankungsmanifestation eine neutrophile Infiltration der submukösen Drüsen [103]. Die neutrophile Infiltration des Atemwegsepithels vermittelt eine Hypersekretion durch direkte Interaktionen, zum Beispiel über Adhäsionsmoleküle, mit Mukusproduzierenden Zellen. Neutrophile Enzyme sind potente Mukusstimulatoren, vor allem die NE [103, 160]. Des Weiteren können Mediatoren von inflammatorischen Zellen, wie den Neutrophilen, die Synthese und Ausschüttung von Neurotransmittern beeinflussen, welche ebenfalls den Inflamationsprozess unterhalten und wie schon erwähnt bei der Mukushypersekretion eine Rolle spielen [103].

Weitere sekretagoge Einflüsse werden über eine Aktivierung des EGF-Rezeptors mit konsekutiver Muzin-Synthese, zum Beispiel durch freie Radikale von aktivierten Neutrophilen, diskutiert [158]. Für das proinflammatorische Zytokin TNF- α wiederum wurde ein stimulierender Einfluss auf die EGFR-Expression in Epithelzellen in Kultur und bei Ratten *in vivo* nachgewiesen [150].

Der Einfluss von GM-CSF auf die Muzinsekretion ließ sich in unserer Arbeitsgruppe auch bei der humanen trachealen Drüsenzelllinie MM39 (MM-39 HTG-Zellen) in einem Zellkulturmodell nachweisen. In anschließenden Untersuchungen gelang der Nachweis der β -Kette des GM-CSF-Rezeptors an MM-39-Zellen, am humanen Bronchus sowie an den glandulären Strukturen der Rattentrachea [154a]. Ein weiterer möglicher Erklärungsweg für die Stimulation der Muzinproduktion ist somit die direkte Rezeptoraktivierung. Ob das Zytokin eine Differenzierung der Drüsenzellen einleitet, woraufhin es zur MUC Expression kommt beziehungsweise direkt die MUC Expression einleitet oder ob es eine Exozytose vermittelt, bleibt zu klären.

4.2.3.2 Untersuchung von Interaktionen zwischen dem Tachykinin SP und GM-CSF bei der Stimulation der Muzinsekretion

Gegenstand der Untersuchung war die Frage, ob eine potentielle Wechselwirkung oder sogar eine additive Wirkung des proinflammatorischen Zytokins GM-CSF und des Tachykinins SP auf die Muzinsekretion nachweisbar ist.

Durch die Kombination mit SP kann ein über die sekretionssteigernde Wirkung von GM-CSF hinausgehender Effekt zu erwarten sein.

Bei vorausgegangenen Kombinationsversuchen in unserer Arbeitsgruppe ergaben sich bezüglich der proinflammatorischen Zytokine folgende Resultate: IL-1 β und IL-6 inhibierten den SP-Effekt, wohingegen MCP-1 und TNF- α keinen Einfluss auf SP zeigten [P. Staats, mündliche Mitteilung].

Zur Überprüfung unserer Fragestellung wurde die Gruppe der 20-Tages-exponierten Fischerratten gewählt, da hier jeweilig signifikante prosekretorische Effekte sowohl für GM-CSF 0,2 ng/ml als auch für SP 1 μ M in dieser Arbeit dokumentiert worden.

In der vorliegenden Arbeit wird bei F344-Ratten die bereits oben demonstrierte signifikante sekretorische Antwort von SP (140,35 % der Basalsekretion) sowie von GM-CSF (122,96 % der Basalsekretion) nochmals aufgezeigt. Bei kombinierter Substitution von SP 1 μ M + GM-CSF 0,2 ng/ml kommt es wiederum zu einer signifikanten Steigerung der Sekretion (140,71 % der Basalsekretion), welche dem Niveau der alleinigen SP-Gabe nahezu entspricht. Im direkten Vergleich der Substanzen untereinander und im Vergleich zur Kombination lässt sich hierbei kein signifikanter Unterschied nachweisen.

Zusammenfassend kommt es bei gemeinsamer muköser Gabe von SP 1 μ M und GM-CSF 0,2 ng/ml zu keiner signifikanten Änderung der Sekretion im Vergleich zur alleinigen Gabe einer der beiden Substanzen. Es lassen sich keine messbaren Wechselwirkungen in Richtung Inhibition oder auch Potenzierung feststellen. Der sekretionssteigernde Effekt entspricht dem Ausmaß der alleinigen SP-Gabe.

Die Tatsache, dass SP auch unabhängig vom Vorhandensein einer induzierten Atemwegsinflammation eine sekretatagoge Wirkung hat, wohingegen GM-CSF lediglich in der längerfristigen Exposition relevant sekretionsfördernd ist, spricht für einen unterschiedlichen Mechanismus.

4.2.3.3 Diskussion von möglichen Interaktionen zwischen GM-CSF und dem adrenergen und cholinergen System

Wie in Tiermodellen nachgewiesen werden konnte, sind adrenerge, cholinerge sowie nicht-adrenerge und nicht-cholinerge Mechanismen an der Kontrolle der Sekretion beteiligt.

Peptiderge Mediatoren aus dem Bereich der NANC-Regulation zeigen Einfluss auf die Muzinsekretion und wurden als Co-Transmitter der „klassischen“ autonomen Nerven identifiziert.

Inflammatorische Mediatoren können möglicherweise die cholinerge Neurotransmission durch Begünstigung der ACh-Freisetzung in parasympathischen Ganglien innerhalb der Atemwege oder von postganglionären Nervenenden steigern [10]. Des Weiteren kann Acetylcholin die GM-CSF Freisetzung durch humane

Epithelzellen der Atemwege über die Stimulation von nikotinergen Rezeptoren beeinflussen [91].

Ob Zusammenhänge der parasympatisch cholinergen oder sympatisch adrenergen Kontrollmechanismen der Atemwegssekretionen zum proinflammatorischen Zytokin GM-CSF aufgezeigt werden können, ist eine interessante Fragestellung für nachfolgende Versuche.

Entsprechend der vorliegenden Versuchsergebnisse hat GM-CSF als proinflammatorisches Zytokin unter Langzeitexposition gegenüber NO₂ mit einer signifikanten Stimulation der Muzinsekretion offenbar eine Bedeutung bei der Steuerung der Mukussekretion. In nachfolgenden Kombinationsversuchen könnten, nach Ausschaltung der sekretorischen Einflüsse des klassischen autonomen Nervensystems (Anticholinergikum: Atropin; β_2 -Blocker: Propranolol; α_1 - und α_2 -Blocker: Phentolamin), Änderungen der sekretorischen Antwort untersucht werden, um zu klären, inwieweit die durch GM-CSF stimulierte Muzinsekretion an der 20 Tages-exponierten Rattentrachea gegenüber 10 ppm NO₂ adrenerge oder cholinerge Mechanismen beteiligt.

4.3 Antinflammatorische Therapieoptionen am Beispiel von GM-CSF

Mukushypersekretion ist ein charakteristisches Merkmal von chronisch inflammatorischen Atemwegserkrankungen wie der COPD. Anticholinergika können die Mukushypersekretion reduzieren, während Beta₂-Agonisten und Mukolytika diesbezüglich wenig Effekte zeigen. Cortikosteroide sind in der Therapie des Asthma bronchiale hocheffektiv, bei der COPD jedoch hinsichtlich der Inhibition der Mukushypersekretion weitgehend ineffektiv [15].

In der Leitlinie der Deutschen Atemwegsliga und Deutschen Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin (DGP) von 2007 [168] sowie in der GOLD-Versionen bis 2011 richtete sich die medikamentöse Stufentherapie lediglich nach dem Schweregrad der Obstruktion. Inzwischen verliert die Spirometrie ihre Bedeutung für die Therapieplanung und es wurde ein Schema etabliert, das auf das Ausmaß der Symptomatik und die Exazerbationsanamnese aufbaut [6c, 168a]. Die aktualisierte Leitlinie [168a] sowie die GOLD-Version [67c] empfehlen zur medikamentösen Therapie der COPD ein stadiengerechtes Vorgehen anhand der ABCD-Krankheitsstadien.

Die Pharmakotherapie stellt einen symptomorientierten Ansatz dar, eine Reversibilität des Verlustes an Lungenfunktion konnte bislang nicht gesichert werden, somit liegt kein kausales Therapieprinzip vor.

Zusätzlich zu gängigen medikamentösen und nicht-medikamentösen Therapiemaßnahmen gibt es neue und experimentelle Therapieansätze, die kausal in das Entzündungsgeschehen bei der COPD eingreifen sollen. In diesem Zusammenhang werden im Folgenden einige „antientzündliche“ Therapiekonzepte genannt.

Pharmakologische Substanzen mit Einfluss auf den Inflamationsprozess sind in klinischer Erprobung, zugelassen ist der Phosphodiesterase-4-Inhibitor Roflumilast bei schwerer COPD [83b]. Der therapeutische Nutzen weiterer Substanzen wird derzeit untersucht, hierbei sind insbesondere Kinase-Inhibitoren (MAPK und PI3K) [10a, 83b], Inhibitoren inflammatorischer Mediatoren, Antioxidantien und Proteinasen zu erwähnen. Gegenstand von Forschungsaktivitäten sind darüber hinaus ein Inhibitor des TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand (TRAIL), Leukotriene [93a], TNF- α , IL-1, IL-8 sowie Epidermal growth factor [15a].

Von einer Assoziation zwischen einer Statintherapie bei kardiovaskulärer und metabolischer Indikation und einem verbesserten Outcome für Patienten mit COPD wird berichtet [77b]. Wang *et al.* beschreiben einen Einfluss von Simvastatin auf den Inflamationsprozess mit Reduktion der Mukushypersekretion [176a].

Therapieansätze, welche die Mukushypersekretion bei der COPD beeinflussen, beinhalten die Inhibition der neutrophilen Chemotaxis und der Neutrophilen-Proteasen. Einige Therapiestrategien mit dem Ziel der Beeinflussung der Mukushypersekretion umfassen den EGFR-Rezeptor, MARCKs-(myristiliertes Alanin-reiches C-Kinase Substrat)-Proteine, Ca²⁺-aktivierte Chlorid-Kanäle sowie Mitogen-aktivierte Proteinkinasen [15]. Des Weiteren ist hier die Inhibition von Neuropeptiden sensorischer Nerven durch Tachikinin-Antagonisten zu nennen [15].

Ein weiteres Ziel für neue Therapieformen bei der COPD könnten dabei auch die proinflammatorischen Zytokine darstellen. Aus Erkenntnissen wissenschaftlicher Arbeiten der letzten Jahre haben diese, wie bereits ausgeführt, eine zentrale Bedeutung im Ablauf der Entzündungsreaktion mit Einfluss auf die Sekretionswirkung mukusproduzierender epithelialer Komponenten bei der COPD, was unter anderem zur Mukushypersekretion beiträgt.

Um in therapeutischer Absicht Hypersekretion spezifisch und damit zielgerichteter beeinflussen zu können, muss die funktionelle Bedeutung einzelner Mediatoren, wie zum Beispiel die der proinflammatorischen und antiinflammatorischen Zytokine, im

Rahmen der inflammatorischen Kaskade [67], und deren Einfluss auf Zellen im Zusammenhang zum Pathomechanismus der Hypersekretion, charakterisiert werden.

Verschiedene residente und einwandernde Zellen, welche zum Teil gleichzeitig auch Effektorzellen sein können, bilden Zytokine. Dies und die teils redundante Wirkung der Zytokine erschwert Eingriffe in das Zytokinnetzwerk in therapeutischer Absicht.

Durch gentherapeutische Überexpression von antiinflammatorischen Zytokinen, wie beispielsweise IL-10 [67] oder Zytokininhibitoren, soll der Ablauf der Entzündungsreaktion beeinflusst werden. Die Verabreichung von adenoviralen Vektoren, die den löslichen TNF- α -Rezeptor kodieren und in der Folge *in vivo* TNF- α inhibieren, führt somit zu einer verminderten inflammatorischen Reaktion. Jedoch wurde in diesem Rahmen auch eine erhöhte Anfälligkeit gegenüber Erregern festgestellt [67].

Die Hemmung von Transkriptionsfaktoren oder von intrazellulären Signaltransduktionswegen bietet ebenfalls eine Therapieoptionen. Inflammatorische Zytokine, wie zum Beispiel IL-8 und TNF- α , werden über p-38 Mitogen aktivierte Protein Kinasen (p38-MAPK) reguliert, so dass die Untersuchung von p38 MAPK-Inhibitoren an Bedeutung gewinnt [15].

Neuere Therapiekonzepte bestehen in der Verabreichung von Zytokinen, aber auch eine selektive Blockade von Zytokinen wie der Einsatz von TNF- α -Inhibitoren ist derzeit Gegenstand von Forschungsaktivitäten.

Bei Eingriffen in das komplexe Zytokinnetzwerk besteht die Möglichkeit eines erhöhten Infektrisikos. Aufgrund der erwähnten redundanten Wirkung vieler Zytokine kann der erwünschte therapeutische Effekt auf die Entzündungskaskade durch die Hemmung eines einzelnen Zytokins möglicherweise ungenügend ausfallen. Randomisierte, kontrollierte Multizenterstudien, die bei Sepsispatienten in diesem Zusammenhang durchgeführt wurden, ergaben keinen klinischen Benefit (beispielsweise die Verabreichung von TNF-Antikörpern, solublen TNF-Rezeptoren, IL-1ra), wobei methodologische Probleme zu erwähnen sind [67]. Die Inhibition von IL-8 durch blockierende Antikörper zeigte hingegen in Tierversuchen teilweise vielversprechende Resultate [67]. Die durch TNF- α dosis- und zeitabhängig induzierte Mucin-Sekretion bei humanen Atemwegszelllinien konnte mittels Infliximab gehemmt werden [103c]. Bei moderater bis schwerer COPD gibt es keinen Anhalt für einen therapeutischen Nutzen für den anti-TNF- α Antikörper Infliximab [133a]. Canakinumab, ein IL-1 β -Antikörper, ist Gegenstand von Untersuchungen hinsichtlich der Bedeutung bei verschiedenen inflammatorischen Erkrankungen wie der COPD [40a]. Biologika spielen bereits eine

Rolle in der Therapie des schweren Asthma bronchiale (monoklonale Antikörper gegen IL-5, IgE und perspektivisch IL-13) [121b, 129a].

Im Folgenden soll auf die Rolle des proinflammatorischen Zytokins GM-CSF in der Pathogenese der COPD und auf dessen mögliche therapeutische Bedeutung näher eingegangen werden. GM-CSF verfügt über ein breites Spektrum an biologischen Funktionen, die in ihrer Gesamtheit für die Ausbildung und Propagation von entzündlichen Reaktionen von Bedeutung sind.

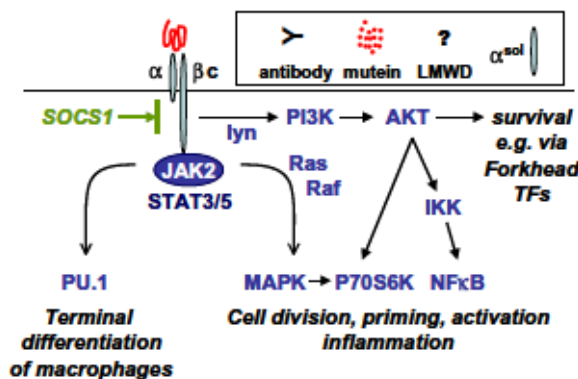


Abbildung 4.1 Signaltransduktion (Interventionsmöglichkeiten für die therapeutische Inhibition von GM-CSF in vivo) [167]

Der immun-stimulierende Effekt von GM-CSF ist bei neutropenen, febrilen Patienten in der klinischen Praxis zur Stimulation der Granulopoese und der Makrophagen etabliert [39].

Darüber hinaus ist GM-CSF ein bedeutsamer Aktivator dieser Zelltypen, welche wiederum eine wesentliche Rolle in der Pathogenese der COPD spielen.

Neutralisierende, gegen GM-CSF oder dessen Rezeptor [32a], beziehungsweise gegen die α-Kette des Rezeptors gerichtete Antikörper stellen eine vielversprechende Strategie dar [167].

Es ist anzunehmen, dass zumindest drei Mechanismen der Antagonisierung von GM-CSF relevant sind [167]: Die Regulation des Wachstums und der Differenzierung von Makrophagen. Die Induktion der neutrophilen Apoptose. Die Inhibition der Inflammation auf der Basis von Transkriptionsfaktoren (AP-1 und NFκB).

Intranasale Applikation von GM-CSF-Antikörpern bei Mäusen, welche Zigarettenrauch exponiert waren, ergab eine signifikante Reduktion von Makrophagen und Neutrophilen in der BAL [165, 166, 167a]. Zusätzlich war eine Supprimierung der Zytokine, Chemokine und Proteasen-mRNA nachweisbar [167].

GM-CSF reguliert die Expression und Aktivierung von inflammatorischen Transkriptionsfaktoren (NF-κB), was durch Kolonisierung der Lunge durch Pathogene

(Lipopolysaccharid) getriggert wird. Die Aktivierung von NF- κ B spielt bei der Transkription proinflammatorischer Gene eine Rolle.

Die Blockade von GM-CSF inhibiert so die proinflammatorische Signaltransduktion, was unter anderem in einer verminderten Synthese von proinflammatorischen Zytokinen wie TNF- α resultiert.

Bezüglich der Signalkaskaden beinhalten alternative Strategien Mimetika von SOCS-1 [112], PI3K-Inhibitoren oder Proteinkinase (Gen: AKT)-Inhibitoren, wodurch GM-CSF unspezifisch inhibiert würde. In diesem Zusammenhang sind auch selektive JAK-Inhibitoren erwähnenswert.

Experimentelle Untersuchungen am Tiermodell der COPD deuten darauf hin, dass neue Phosphodiesterase-Inhibitoren [130] genauso wie Resveratrol [49], eine Rotweinkomponente, GM-CSF supprimieren.

Niedermolekulare Substanzen, welche selektiv GM-CSF antagonisieren, wurden darüber hinaus noch nicht beschrieben [167].

Zusammengefasst kann GM-CSF als Zielmolekül einer entzündungshemmenden Therapie dazu beitragen, den durch Schadstoffe induzierten Inflamationsprozess bei der COPD einzudämmen und somit einer Hypersekretion von Muzin entgegen wirken.

5 Zusammenfassung

Eine Facette des klinischen Erscheinungsbildes der „chronic obstructive pulmonary disease“ (COPD) ist die chronische Bronchitis mit einem überwiegend inflammatorischen Korrelat.

Der Pathogenese der chronischen Bronchitis liegen komplexe pathophysiologische Vorgänge zugrunde, welche bislang nur unvollständig bekannt und im Einzelnen nicht vollständig geklärt sind.

Die Definition der „global initiative on obstructive lung disease“ (GOLD) erwähnt eine abnormale inflammatorische Reaktion der Lunge auf schädliche Partikel und Gase und rückt somit die Entzündung ins Zentrum der Pathogenese.

Zigarettenrauch und wichtige Umwelttoxene wie Stickstoffdioxid (NO_2) führen über die hervorgerufene Entzündung bei Menschen und anderen Spezies zu Veränderungen des Atemwegsepithels und zur Stimulation der Produktion von proinflammatorischen Zytokinen wie dem Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierenden Faktor (GM-CSF). Die strukturellen Veränderungen schließen auch die Mucin-produzierenden epithelialen Komponenten ein.

Ein relevantes klinisches Symptom der chronischen Bronchitis stellt die Hypersekretion dar.

Die Regulation der Muzinsynthese und -sekretion unterliegt komplexen neuronalen, neuroendokrinen und parakrinen Mechanismen.

Mit dem Ziel, zugrunde liegende Regulationsmechanismen der Mukussekretion bei der chronisch inflammatorischen Erkrankung COPD näher zu charakterisieren, liegt der Schwerpunkt dieser Arbeit in der Bedeutung des proinflammatorischen Zytokins GM-CSF.

Folgenden Fragen, welchen eine Bedeutung bei der Regulation der Mukussekretion zukommt, wird in der vorliegenden Arbeit nachgegangen:

Welchen Einfluss hat die Lang- und Kurzzeitexposition von NO_2 auf die tracheobronchiale Mucinsekretion? Welchen Einfluss zeigt die peptiderge Substanz P (SP) auf die Mucinsekretion exponierter Tiere auch im Speziesvergleich? Wirkt das proinflammatorische Zytokin GM-CSF sekretagog? Gibt es interaktive Prozesse zwischen dem Zytokin GM-CSF und dem Tachykinin SP im Hinblick auf die Sekretomodulation?

Zur experimentellen Klärung dieser Fragestellungen wurde ein etabliertes Tiermodell gewählt. Für das Studium der Reaktionsweise entzündlich alterierter Atemwege erfolgte die inhalative Exposition gegenüber NO_2 im Rattenmodell.

Die Muzinsekretion wurde an Trachealexplantaten von Fischerratten (F344-Ratten) und Sprague-Dawley-Ratten (SD-Ratten) durch die Anwendung der etablierten Ussing-Kammer-Methode untersucht.

Zur Quantifizierung der Sekretion trachealer submuköser Drüsen erfolgte die radioaktive Markierung der Muzine mit ^{35}S .

Zum Studium der trachealen Muzinsekretion erfolgte die inhalative Exposition mit Induktion einer Schädigung und Herbeiführung einer akuten und subakuten bis chronischen Tracheobronchitis.

Mit standardisierter Methodik wurden bei männlichen Ratten der jeweiligen Spezies Expositionszeiten von 1, 3 und 20 Tagen sowie darüber hinaus teilweise von 2 und 28 Tagen gegenüber NO_2 bei einer Konzentration von 10 ppm gewählt. Kontrolltiere wurden einer Atmosphäre ohne NO_2 ausgesetzt.

Neben der Basalsekretion wurde zunächst an den Trachealexplantaten die maximal stimulierte Sekretion durch Acetylcholin (ACh) in Stadien der artifiziellen Entzündung und im Nativzustand erfasst. Mit diesen Grundlagen kann ein sekretomodulatorischer Effekt des Peptides SP und eine Dosis-Wirkungs-Beziehung des proinflammatorischen Zytokins GM-CSF im zeitlichen Verlauf unter NO_2 -Exposition untersucht werden. Zudem wurde hinsichtlich des Sekretionsergebnisses die Frage nach einem additiven Effekt von GM-CSF und SP an langzeit-exponierten Tracheen untersucht.

Die Sekretionsanalyse ergab, dass eine NO_2 -Exposition von 10 ppm die Muzinsekretion der Rattentrachea beider Spezies zeitabhängig nicht signifikant beeinflusst. Es zeigten sich allerdings gleichgerichtete Tendenzen ohne Signifikanz im Sekretionsverlauf. Im Speziesvergleich zeigten dabei SD-Ratten eine größere sekretorische Potenz im Vergleich zu F344-Ratten im Sinne eines nahezu parallel verschobenen Sekretionsniveaus auf.

Darüber hinaus wurde die Sekretionsrate nativ und bis zu einer Expositionsdauer von 20 Tagen bei beiden Spezies durch Acetylcholin im Vergleich zur Basalsekretion signifikant gesteigert. Hierbei fanden sich im direkten Vergleich zu den nativen Fischerratten wiederum signifikante Differenzen nach 3 sowie 20 Tagen.

Signifikante sekretagoge Effekte von Substanz P ließen sich bei Fischerratten und SD-Ratten sowohl bei den Kontrolltieren als auch bei nahezu allen untersuchten Expositionsgruppen aufzeigen.

GM-CSF zeigte in unserem Rattenmodell der COPD dosis- und expositionszeitabhängig eine Stimulation der trachealen Muzinsekretion. Eine signifikante Sekretionsantwort in der 3-Tages-Expositionsgruppe konnte für 0,1 ng/ml GM-CSF und für 0,4 ng/ml GM-CSF demonstriert werden. Zudem fand sich eine

Signifikanz in der 20-Tages-Expositionsgruppe für 0,1 und 0,15 sowie 0,2 ng/ml GM-CSF. Für die Dosis von 0,2 ng/ml GM-CSF ergab sich ein hochsignifikantes Ergebnis.

Die gleichzeitige Gabe von GM-CSF und SP zeigte in der Langzeitexposition keinen messbaren additiven sekretagen Effekt und ergab das Sekretionsniveau von SP. Dies wurde nach 20 Tagen Expositionsdauer untersucht, da für diese Gruppe für beide Einzelsubstanzen jeweils eine signifikante Sekretionsantwort gesehen wurde. Die mutmaßlich unterschiedlichen sekretagen Mechanismen von SP und GM-CSF sind vereinbar mit der Beobachtung, dass SP auch unabhängig vom Vorhandensein einer Atemwegsinflammation wirksam ist.

Diese Ergebnisse liefern einen Beitrag zum Verständnis der Komplexität der bei der Regulation der Muzinsekretion beteiligten Pathomechanismen des Tracheobronchialepithels in der chronischen Bronchitis. Der sekretagoge Effekt von GM-CSF in der chronischen Inflammation wurde demonstriert. Mit dem Ziel einer Beeinflussung der Hypersekretion bei der COPD ist hier ein zielgerichteter therapeutischer Ansatz denkbar. Der Einsatz von neutralisierenden Antikörpern gegen GM-CSF oder dessen Rezeptor ist als spezifisches Therapiekonzept vorstellbar. Dieses ist in Ergänzung zu den etablierten antiinflammatorischen therapeutischen Möglichkeiten bei der COPD zu sehen und ermöglicht im Gegensatz dazu ein zielgerichtetes Eingreifen in die inflammatorische Kaskade. Es bedarf weiterer Untersuchungen, um die Rolle einer solchen Herangehensweise zu konkretisieren.

Summary

One facet of the clinical manifestation of chronic obstructive pulmonary disease (COPD) is chronic bronchitis, with inflammation being the predominant correlating factor.

The pathogenesis of chronic bronchitis is based on complex pathophysiological processes, which are currently not fully known and have not yet been fully clarified, in detail.

The definition from the "global initiative on obstructive lung disease" (GOLD) mentions an abnormal inflammatory reaction of the lung to harmful particles and gases, thus putting inflammation at the centre of the pathogenesis.

Cigarette smoke and important environmental noxae such as nitrogen dioxide (NO₂) cause changes in the respiratory epithelium of humans and other species through eliciting inflammation and stimulate the production of pro-inflammatory cytokines, such as granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF). These structural changes also involve the mucin-producing epithelial components.

One relevant clinical symptom of chronic bronchitis is hypersecretion.

The regulation of mucin synthesis and secretion is subject to complex neural, neuro-endocrine and paracrine mechanisms.

With the aim of characterising the underlying regulatory mechanisms of mucus secretion in the chronic inflammatory disease COPD, the focus of this work is on the significance of the pro-inflammatory cytokine GM-CSF.

The following questions that are of importance for the regulation of mucus secretion will be investigated in this paper:

What influence do long- and short-term exposure of NO₂ have on tracheobronchial mucin secretion? What influence does the peptidergic substance substance P (SP) have on the mucin secretion of exposed animals, and how does this compare by species? Does the pro-inflammatory cytokine GM-CSF act as a secretagogue? Are there interactive processes between the cytokine GM-CSF and the tachykinin SP with regard to secretion modulation?

An established animal model was chosen for the experimental clarification of these questions. To study the mode of response of respiratory tracts altered through inflammation, inhalative exposure to NO₂ was implemented in rats.

Mucin secretion was investigated in tracheal explants of Fischer rats (F344 rats) and Sprague-Dawley rats (SD rats) using the established Ussing chamber method.

In order to quantify the secretion of tracheal submucosal glands, the mucin underwent radioactive labelling with ^{35}S .

In order to study tracheal mucin secretion, inhalative exposure was implemented, with damage induced and acute and subacute to chronic tracheobronchitis brought about.

Using standardised methods, exposure times of 1, 3 and 20 days were selected for male rats of the species in question, as well as of 2 and 28 days, in some cases, to NO_2 at a concentration of 10 ppm. Control animals were subject to an atmosphere without NO_2 .

In addition to basal secretion, initially, the maximum stimulated secretion due to acetylcholine (ACh) was recorded on the tracheal implants in stages of artificial inflammation and in the natural state. With an understanding of these foundations, the secreto-modulatory effect of the peptide SP and the dose–response relationship of the pro-inflammatory cytokine GM-CSF can then be investigated over time under exposure to NO_2 . In addition, the question of any additive effect of GM-CSF and SP in terms of secretion result was investigated in tracheas exposed long-term.

The secretion analysis showed that NO_2 exposure of 10 ppm does not significantly influence tracheal mucin secretion in rats of either species in a time-dependent manner. However, similar trends were demonstrated that were of no significance over the course of secretion. In the species comparison, SD rats exhibited a greater secretory potential compared to F344 rats, in line with an almost parallel shift in secretion level.

What is more, in both species, the natural secretion rate and that up until an exposure duration of 20 days was significantly increased by acetylcholine compared to basal secretion. Here, again, in a direct comparison with the native Fischer rats, significant differences were noted after 3 and 20 days.

Significant secretagogic effects were able to be demonstrated for substance P in Fischer rats and SD rats, both in the control animals and in almost all the exposure groups investigated.

GM-CSF was shown to stimulate tracheal mucin secretion in our COPD rat model in a manner that was both dose- and exposure-time-dependent. A significant secretory response was able to be demonstrated in the 3-day exposure group for 0.1 ng/ml GM-CSF and for 0.4 ng/ml GM-CSF. In addition, significance was noted in the 20-day exposure group for 0.1 and 0.15 as well as 0.2 ng/ml GM-CSF. A highly significant result was obtained for the dose of 0.2 ng/ml GM-CSF.

Simultaneous administration of GM-CSF and SP did not indicate any measurable additive secretagogic effect over long-term exposure and resulted in the secretion level

of SP. This was investigated after 20 days of exposure, since for this group, a significant secretory response was seen for both individual substances. The supposedly different secretagogic mechanisms of SP and GM-CSF are compatible with the observation that SP is in any case effective regardless of the presence of any respiratory inflammation.

These results contribute to the understanding of the complexity of the tracheobronchial epithelium pathomechanisms involved in the regulation of mucin secretion in chronic bronchitis. The secretagogic effect of GM-CSF in the presence of chronic inflammation was demonstrated. Here, a targeted therapeutic approach is conceivable, with the aim of influencing hypersecretion in cases of COPD. The use of neutralising antibodies against GM-CSF or its receptor is plausible as a specific therapy concept. This should be viewed in addition to the established anti-inflammatory therapeutic options for COPD and, by contrast, enables targeted intervention in the inflammatory cascade. Further research is needed to substantiate the role of such an approach.

Literaturverzeichnis

- [1] Adler, K. B., Fischer, B. M., Wright, D. T., Cohn, L. A. & Becker, S. Interactions between respiratory epithelial cells and cytokines: relationships to lung inflammation, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 128–145 (1994).
- [2] Adler, K. B. & Li, Y. Airway epithelium and mucus: intracellular signaling pathways for gene expression and secretion, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **4**, 397–400 (2001).
- [2a] Adeloye, D., Chua, S., Lee, C. *et al.* Global Health Epidemiology Reference Group. Global and regional estimates of COPD prevalence: systematic review and metaanalysis, *J Glob health* **5**, 020415 (2015).
- [3] Akazawa, M., Halpern, R., Riedel, A. A., Stanford R. H., Dalal A. & Blanchette C. M. Economic burden prior to COPD diagnosis: A matched case-control study in the United States, *Respiratory Medicine* **12**, 1744-1752 (2008).
- [3a] Allinson, J.P., Hardy, R., Donaldson G.C. *et.al.* The Presence of Chronic Mucus Hypersecretion across Adult Life in Relation to Chronic Obstructive Pulmonary Disease Development, *Am J Respir Crit Care Med.* **193 (6)**: 662-72 (2016).
- [4] Al-Shami, A. & Naccache, P. H. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-activated signaling pathways in human neutrophils. Involvement of Jak2 in the stimulation of phosphatidylinositol 3-kinase, *J. Biol. Chem.* **9**, 5333–5338 (1999).
- [5] Amon, D. A. Auswirkungen einer Stickstoffdioxid-Exposition auf die tracheale Muzinsekretion am Rattenmodell, Inaugural-Dissertation, Philipps-Universität Marburg (1999).
- [6] Andreas, S., Hering, T., Mühlig, S. *et al.* Smoking cessation in chronic obstructive pulmonary disease: an effective medical intervention, *Deutsches Ärzteblatt* **16**, 276-82 (2009).
- [6a] Antus, B., Kardos, Z. Oxidative Stress in COPD: molecular background and clinical monitoring, *Curr. Med. Chem.* **22 (5)**, 627- 650 (2015).
- [6b] Atsou, K., Chouaid, C., Hejblum, G. Variability of the chronic obstructive pulmonary Disease key epidemiological data in europe: systematic review, *BMC Med.* **18**; 9:7 (2011).
- [6c] AWMF online - Das Portal der wissenschaftlichen Medizin: Leitlinien, URL: <https://www.awmf.org/leitlinien/detail/anmeldung/1/II/nvl-003.html> (Abrufdatum: 30.01.2019)

-
- [7] Bagley, C. J., Woodcock, J. M., Guthridge, M. A., Stomski, F. C. & Lopez, A. F. Structural and functional hot spots in cytokine receptors, *Int. J. Hematol.* **3**, 299–307 (2001).
- [8] Baker, B., Peatfield, A. C. & Richardson, P. S. Nervous control of mucin secretion into human bronchi, *J. Physiol. (Lond.)*, 297–305 (1985).
- [9] Balbi, B., Bason, C., Balleari, E. *et al.* Increased bronchoalveolar granulocytes and granulocyte/macrophage colony-stimulating factor during exacerbations of chronic bronchitis, *Eur. Respir. J.* **4**, 846–850 (1997).
- [10] Barnes, P. J. Neuroeffector mechanisms: the interface between inflammation and neuronal responses, *J. Allergy Clin. Immunol.* **5 Pt 2**, S73–81; discussion S81–3 (1996).
- [10a] Barnes, P.J., Celli, B.R. Systemic manifestation and comorbidities of COPD, *Eur. Resp. J.* **33**: 1165–1185 (2009).
- [11] Barnes, P. J. Chronic obstructive pulmonary disease, *N. Engl. J. Med.* **4**, 269–280 (2000).
- [12] Barnes, P. J. Neurogenic inflammation in the airways, *Respiration physiology* **1-2**, 145–154 (2001).
- [13] Barnes, P. J. New concepts in chronic obstructive pulmonary disease, *Annu. Rev. Med.*, 113–129 (2003).
- [14] Barnes, P. J. Mediators of chronic obstructive pulmonary disease, *Pharmacol. Rev.* **4**, 515–548 (2004).
- [15] Barnes, P. J. Current and future therapies for airway mucus hypersecretion, *Novartis Found Symp.*, 237–49 (2002).
- [15a] Barnes, P. J. New anti-inflammatory targets for chronic obstructive pulmonary disease, *Nat. Rev. drug Discov.* **12**, 543–59 (2013).
- [16] Barnes, P. J., Haddad, E. B. & Rousell, J. Regulation of muscarinic M2 receptors, *Life Sci.* **13-14**, 1015–1021 (1997).
- [16a] Barth, P. J., Uhlarik, S., Bittinger, A., Wagner, U. & Rüschoff, J. Diffuse alveolar damage in the rat lung after short and long term exposure to nitrogen dioxide, *Pathol. Res. Pract.* **1**, 33–41 (1994).
- [17] Basbaum, C. B. Regulation of secretion from serous and mucous cells in the trachea, *Ciba Found. Symp.*, 4–19 (1984).

-
- [18] Basbaum, C. B., Madison, J. M., Sommerhoff, C. P., Brown, J. K. & Finkbeiner, W. E. Receptors on airway gland cells. *Am Rev Respir Dis.* **3 Pt 2**, S141-4 (1990).
- [19] Basbaum, C., Lemjabbar, H., Longphre, M. *et al.* Control of mucin transcription by diverse injury-induced signaling pathways, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **5 Pt 2**, S44-8 (1999).
- [20] Beeh, K. M., Beier, J., Kornmann, O., Mander, A. & Buhl, R. Long-term repeatability of induced sputum cells and inflammatory markers in stable, moderately severe COPD, *Chest* **3**, 778–783 (2003).
- [21] Beeh, K. M., Kornmann, O., Buhl, R. *et al.* Neutrophil chemotactic activity of sputum from patients with COPD: role of interleukin 8 and leukotriene B₄, *Chest* **4**, 1240–1247 (2003).
- [22] Begley, C. G., Lopez, A.F., Nicola, N. A., Warren, D. J., Vadas, M. A., Sanderson, C. J. & Metcalf, D. Purified colony-stimulating factors enhance the survival of human neutrophils and eosinophils in vitro: a rapid and sensitive microassay for colony-stimulating factors. *Blood* **1**, 162-6 (1986).
- [22a] Behrens, F., Tak, P. P., Ostergaard, M. *et al.* MOR103, a human monoclonal antibody to granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, in the treatment of patients with moderate rheumatoid arthritis: results of a phase Ib/Ia randomized, double-blind, placebo-controlled, dose-escalation trial, *Ann Rheum Dis* **74**(6), 1058-64 (2015).
- [23] Bergmann, M., Barnes, P. J. & Newton, R. Molecular regulation of granulocyte macrophage colony-stimulating factor in human lung epithelial cells by interleukin (IL)-1 β , IL-4, and IL-13 involves both transcriptional and post-transcriptional mechanisms, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **5**, 582–589 (2000).
- [24] Betz, R., Kohlhäufel, M., Kassner, G., Müllinger, B., Maier, K., Brand, P., Weber, N., Häussinger, K., Heyder, J. & Frankenberger M. Increased sputum IL-8 and IL-5 in asymptomatic nonspecific airway hyperresponsiveness. *Lung* **2**, 119-33 (2001).
- [24a] Bhattachary, P., Thiruppathi, M., Elshabrawy, H.A. *et al.* GM-CSF: an immune modulatory cytokine that can suppress autoimmunity, *Cytokine* **75**(2), 261-71 (2015).
- [25] Bils, R. F. & Christie, B. R. The experimental pathology of oxidant and air pollutant inhalation, *International review of experimental pathology*, 195–293 (1980).
- [26] Blomberg, A., Krishna, M. T., Helleday, R. *et al.* Persistent airway inflammation but accommodated antioxidant and lung function responses after repeated daily exposure to nitrogen dioxide, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **2**, 536–543 (1999).

-
- [27] Boer, W. I. de. Cytokines and therapy in COPD: a promising combination?, *Chest* **5 Suppl**, 209S-218S (2002).
- [28] Borchers, M. T., Carty, M. P. & Leikauf, G. D. Regulation of human airway mucins by acrolein and inflammatory mediators, *Am. J. Physiol.* **4 Pt 1**, L549-55 (1999).
- [29] Borish, L. C. & Steinke, J. W. 2. Cytokines and chemokines, *J. Allergy Clin. Immunol.* **2 Suppl**, S460-75 (2003).
- [30] Borson, D. B., Charlin, M., Gold, B. D. & Nadel, J. A. Neural regulation of $^{35}\text{SO}_4$ -macromolecule secretion from tracheal glands of ferrets, *J. Appl. Physiol.* **2**, 457-466 (1984).
- [31] Borson, D. B., Gashi, A. A., Nadel, J. A. Methods for studying secretions from airways, In: Braga, P.C. and Allegra, L. Methods in bronchial mucology, NewYork: Raven Press, 303-320 (1988).
- [32] Borson, D. B., Corrales, R., Varsano, S., Gold, M., Viro, N., Caughey, G., Ramachandran, J. & Nadel, J. A. Enkephalinase Inhibitors Potentiate Substance P-Induced Secretion of $^{35}\text{SO}_4$ -Macromolecules from Ferret Trachea, *Experimental Lung Research* **12**, 21-36 (1987).
- [32a] Botelho, F.M., Nikota, J.K., Bauer, C. *et al.* A mouse GM-CSF-receptor antibody attenuates neutrophilia in mice exposed to cigarette smoke, *Eur Resp J* **38**, 285-294 (2011).
- [33] Bredenbröker, D. Untersuchungen zur nonadrenergen noncholinergen Regulation der Mukussekretion der Rattentrachea durch die Tachykinine und andere peptiderge Mediatoren, Inaugural-Dissertation, Philipps-Universität Marburg (1997).
- [34] Buist, A. S., McBurnie, M. A., Vollmer W. M. *et al.* International variation in the prevalence of COPD (The BOLD Study): a population-based prevalence study, *Lancet*, 741–50 (2007).
- [34a] Burmester, G.R., Feist, E., Sleemann, M.A. *et al.* Mavrilimumab, a human monoclonal antibody targeting GM-CSF receptor-alpha, in subjects with rheumatoid arthritis: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase I, first-in-human study, *Ann Rheum Dis* **70**, 1542-9 (2011).
- [35] Caramori, G., Di Gregorio, C., Carlstedt, I. *et al.* Mucin expression in peripheral airways of patients with chronic obstructive pulmonary disease, *Histopathology* **5**, 477–484 (2004).

-
- [36] Carstairs, J. R., Nimmo, A. J. & Barnes, P. J. Autoradiographic visualization of beta-adrenoceptor subtypes in human lung, *Am. Rev. Respir. Dis.* **3**, 541–547 (1985).
- [37] Cates, E. C., Gajewska, B. U., Goncharova, S. *et al.* Effect of GM-CSF on immune, inflammatory, and clinical responses to ragweed in a novel mouse model of mucosal sensitization, *J. Allergy Clin. Immunol.* **5**, 1076–1086 (2003).
- [38] Chen, G., Grotendorst, G., Eichholtz, T. & Khalil, N. GM-CSF increases airway smooth muscle cell connective tissue expression by inducing TGF-beta receptors, *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* **3**, L548-56 (2003).
- [38a] Chen, P., Deng, Z., Wang, T. *et al.* The potential interaction of MARCKS-related peptide and diltiazem on acroline-induced airway mucus hypersecretion in rats, *Int Immunopharmacol* **17**, 625-32 (2013).
- [39] Choi, J. C., Jung, J. W., Kwak, H. W. *et al.* Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor (GM-CSF) Augments Acute Lung Injury via Its Neutrophil Priming Effects, *J Korean Med Sci* **2**, 288-95 (2008).
- [39a] Choi, J. K., Kim, K. H., Park, H., Park S. R., Choi B. H. Granulocyte macrophage-colony stimulating factor shows anti- apoptotic activity in neural progenitor cells via JAK/STAT5-Bcl-pathway, *Apoptosis* **16**, 127-34 (2011).
- [40] Chung, K. F. Cytokines in chronic obstructive pulmonary disease, *The European respiratory journal. Supplement*, 50s-59s (2001).
- [40a] Church, L.D., McDermott, M.F. Canakinumab, a fully-human aAb against IL-1beta for the potential treatment of inflammatory disorders, *Curr Opin Mol Ther.* **11**, 81-9 (2009).
- [40b] Churg, A., Cosio, M., Wright, J.L. Mechanisms of cigarette smoke-induced COPD: insights from animal models, *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **294**, L612-L631 (2008).
- [41] Colasurdo, G. N., Loader, J. E., Graves, J. P. & Larsen, G. L. Modulation of acetylcholine release in rabbit airways in vitro, *Am. J. Physiol.* **3 Pt 1**, L432-7 (1995).
- [42] Coleridge, H. M. & Coleridge, J. C. G. PULMONARY REFLEXES: Neural Mechanisms of Pulmonary Defense, *Annu. Rev. Physiol.*, 69-91 (1994).
- [43] Coles, S. J., Neill, K. H. & Reid, L. M. Potent stimulation of glycoprotein secretion in canine trachea by substance P, *J Appl Physiol.* **5**, 1323-7 (1984).
- [43a] Comalada, M., Xaus, J., Sanches, E. *et al.* Macrophage colony-stimulating factor-, or IL-3-dependent survival of macrophages, but not proliferation, requires the

expression of p21(Waf1) through the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway, *Eur J Immunol* **34**, 2257-67 (2004).

[44] Connor, L. M., Bidani, A., Goerke, J., Clements, J. A. & Postlethwait, E. M. NO₂ interfacial transfer is reduced by phospholipid monolayers, *J. Appl. Physiol.* **5**, 2024–2034 (2001).

[44a] Conti, L., Gessani, S. GM-CSF in the generation of dendritic cells from human blood monocyte precursors: recent advances, *Immunobiology* **213**, 859-70 (2008).

[45] Coxon, A., Tang, T. & Mayadas, T. N. Cytokine-activated endothelial cells delay neutrophil apoptosis in vitro and in vivo. A role for granulocyte/macrophage colony-stimulating factor, *J. Exp. Med.* **7**, 923–934 (1999).

[46] Cromwell, O., Hamid Q., Corrigan, C. J. *et al.* Expression and generation of interleukin-8, IL-6 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor by bronchial epithelial cells and enhancement by IL-1 beta and tumour necrosis factor-alpha, *Immunology* **3**, 330–337 (1992).

[47] Culp, D. J., McBride, R. K., Graham, L. A. & Marin, M. G. Alpha-adrenergic regulation of secretion by tracheal glands, *Am. J. Physiol.* **4 Pt 1**, L198-205 (1990).

[48] Culpitt, S. V., Rogers, D. F., Shah, P. *et al.* Impaired inhibition by dexamethasone of cytokine release by alveolar macrophages from patients with chronic obstructive pulmonary disease, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **1**, 24–31 (2003).

[49] Culpitt, S. V., Rogers, D. F., Fenwick, P. S. *et al.* Inhibition by red wine extract, resveratrol, of cytokine release by alveolar macrophages in COPD, *Thorax* **11**, 942–946 (2003).

[50] Davies, J. R., Corbishley, C. M. & Richardson, P. S. The uptake of radiolabelled precursors of mucus glycoconjugates by secretory tissues in the feline trachea, *J. Physiol. (Lond.)*, 19–30 (1990).

[51] Davies, R. J. & Devalia, J. L. Air pollution and airway epithelial cells, *Agents Actions Suppl.*, 87-96 (1993).

[52] Davis, B. & Nadel, J. A. New methods used to investigate the control of mucus secretion and ion transport in airways, *Environ. Health Perspect.*, 121–130 (1980).

[52a] Deutsches Zentrum für Lungenforschung: Positionspapier Deutsche Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin e.V., URL: <https://www.dzl.de/Index.php/de/presse> (Abrufdatum: 30.01.2019).

- [53] Devalia, J. L., Campbell, A. M., Sapsford, R. J. *et al.* Effect of nitrogen dioxide on synthesis of inflammatory cytokines expressed by human bronchial epithelial cells in vitro, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **3**, 271–278 (1993).
- [54] Di Stefano, A., Maestrelli, P., Roggeri A. *et al.* Upregulation of adhesion molecules in the bronchial mucosa of subjects with chronic obstructive bronchitis, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **3 Pt 1**, 803–810 (1994).
- [55] Doidge J. M. & Satchell D. G. Adrenergic and non-adrenergic inhibitory nerves in mammalian airways. *J Auton Nerv Syst.* **2**, 83-99 (1982).
- [56] Dranoff, G., Jaffee, E., Lazenby, A. *et al.* Vaccination with irradiated tumor cells engineered to secrete murine granulocyte-macrophage colony-stimulating factor stimulates potent, specific, and long-lasting anti-tumor immunity, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **8**, 3539–3543 (1993).
- [57] Drazen, J. M., Takebayashi, T., Long, N. C., Sanctis, G. T. de & Shore, S. A. Animal models of asthma and chronic bronchitis, *Clin. Exp. Allergy*, 37–47 (1999).
- [58] Dyarmand, D. Untersuchungen zur Bedeutung von “Second messenger“-Systemen bei der trachealen Muzinsekretion im Rattenmodell unter besonderer Berücksichtigung von cGMP und Calcium als Botenstoffen, Inaugural-Dissertation, Philipps-Universität Marburg (2000).
- [58a] Ebner, K., Bandion, A., Binder B.R. *et al.* GM-CSF activates NF-kappaB via direct interaction of the GM-CSF receptor with Ikappa B kinase beta, *Blood* **102**, 192-9 (2003).
- [59] Elsayed, N. M. Toxicity of nitrogen dioxide: an introduction, *Toxicology* **3**, 161–174 (1994).
- [60] Esnault, S. & Malter, J. S. Extracellular signal-regulated kinase mediates granulocyte-macrophage colony-stimulating factor messenger RNA stabilization in tumor necrosis factor-alpha plus fibronectin-activated peripheral blood eosinophils, *Blood* **11**, 4048–4052 (2002).
- [60a] European Environment Agency: Air quality in Europe-2018 report, URL: <https://www.eea.europa.eu/publications/air-quality-in-Europe-2018> (Abrufdatum: 30.01.2019).
- [60b] EUROPEAN LUNG white book: Chronic obstructive pulmonary disease, URL: <https://www.erswhitebook.org/chapters/chronic-obstructive-pulmonary-disease/> (Abrufdatum: 30.01.2019).

- [60c] EUROPEAN LUNG white book: Chronic obstructive pulmonary disease, URL: <https://www.erswhitebook.org/chapters/the-economic-burden-of-lung-disease/> (Abrufdatum: 30.01.2019).
- [61] Evans, M. J. Oxidant gases, *Environ. Health Perspect.*, 85–95 (1984).
- [62] Fahy, J. V. Goblet cell and mucin gene abnormalities in asthma, *Chest* **6 Suppl**, 320S-326S (2002).
- [62a] Fahy, J.V., Dickey, B.F. Airway mucus function and dysfunction, *N Engl J Med* **363**, 2233-47 (2010).
- [62b] Ferre, A., Fuhrmann, C., Zureik, M. *et al.* Chronic bronchitis in the general population: influence of age, gender and socioeconomic conditions, *Respir Med* **106**: 467-471 (2012).
- [63] Forstner, G. Signal transduction, packaging and secretion of mucins, *Annu. Rev. Physiol.*, 585–605 (1995).
- [63a] Friedman, M. The use of ranks to avoid the assumption of normality implicit in the analysis of variance. *J. Amer. Stat. Assoc.* 32, pp.675-701 (1937).
- [64] Garn, H., Siese, A., Stumpf, S. *et al.* Shift toward an alternatively activated macrophage response in lungs of NO₂-exposed rats, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **3**, 386–396 (2003).
- [65] Gashi, A. A., Borson, D. B., Finkbeiner, W. E., Nadel, J. A. & Basbaum, C. B. Neuropeptides degranulate serous cells of ferret tracheal glands. *Am J Physiol.* **2 Pt 1**, C223-9 (1986).
- [66] Gashi, A. A., Nadel, J. A. & Basbaum, C. B. Autoradiographic studies of the distribution of ³⁵sulfate label in ferret trachea: effects of stimulation, *Exp. Lung Res.* **1**, 83–96 (1987).
- [67] Geiser, T. [Inflammatory cytokines and chemokines in acute inflammatory disease], *Schweizerische medizinische Wochenschrift* **14**, 540–546 (1999).
- [67a] Geldmacher, H., Biller, H., Herbst, A., Urbanski, K., Allison, M., Buist, A. S., Hohlfeld, J. M., Welte, T. Die Prävalenz der chronisch obstruktiven Lungenerkrankung (COPD) in Deutschland, *Dtsch med Wochenschr*, 2609-2614 (2008).
- [67b] Gershon, A.S., Dolmage, T.E., Stephenson, A. *et al.* Chronic obstructive pulmonary disease and socioeconomic status: a systematic review, *COPD* **9(3)**, 216-226 (2012).

- [67c] Global Initiative for chronic Obstructive Lung Disease. GOLD 2017 Global Strategy for Diagnosis, Management, and Prevention of COPD, URL: <https://goldcopd.org/gold-2017-global-strategy-diagnosis-management-prevention-copd/> (Abrufdatum: 25.01.2019).
- [68] Greim, H. Stickstoffdioxid Auswirkungen auf Mensch und Umwelt: Ein Überblick, Institut für Toxikologie und Umwelthygiene, Technische Universität München(2008), http://www.eugt.org/tl_files/downloads_public/no2_workshop_2008/vortrag_greim_no2_summary.pdf
- [69] Groneberg, D. A., Quarcoo, D., Frossard, N., Fischer, A. Neurogenic mechanisms in bronchial inflammatory diseases, *Allergy*, 1139–1152 (2004).
- [69a] Guerra, S., Sherrill, D.L., Venker, C. *et al.* Chronic bronchitis before age 50 years predicts incident airflow limitation and mortality risk, *Thorax* **64**, 894-900 (2009).
- [70] Guo, R.-F. & Ward, P. A. Mediators and regulation of neutrophil accumulation in inflammatory responses in lung: insights from the IgG immune complex model, *Free Radic. Biol. Med.* **3**, 303–310 (2002).
- [70a] Halbert, R.J., Natoli, J.L., Gano, A. *et al.* Global burden of COPD: systematic review and meta-analysis. *Eur Respir J* **28**, 523-532 (2006).
- [71] Hamilton, J. A. GM-CSF in inflammation and autoimmunity, *Trends Immunol.* **8**, 403–408 (2002).
- [71a] Hamilton, T.A., Zhao, C., Pavicic, Jr P. G., Datta, S. Myeloid colony-stimulating factors as regulators of macrophage polarization, *Front Immunol* **5**, 554 (2014).
- [71b] Hao, W., Wang, J., Zhang, Y *et.al.* Leptin positively regulates MUC5AC production and secretion induced by interleukin-13 I human bronchial epithel cells, *Biochem Biophys Res Commun* **493**, 979-984 (2017).
- [71c] Hartung, J. Lehr- und Handbuch der angewandten Statistik. Oldenbourg Verlag München (1989).
- [72] Haslett, C. Granulocyte apoptosis and its role in the resolution and control of lung inflammation, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **5 Pt 2**, S5-11 (1999).
- [73] Heitmann, R. H. & Schultz, K. COPD: Epidemiologie, Versorgungsbedarf und Defizite, Vortrag von Dr. Heitmann auf dem Symposium “Pneumologie” der Albert Schweitzer Klinik, Königsfeld, <http://www.mediclin.de/download/COPD/pdf> 2006.

-
- [74] Hele, D. First Siena International Conference on animal models of chronic obstructive pulmonary disease, Certosa di Pontignano, University of Siena, Italy, September 30-October 2, 2001, *Respir. Res.*, 12 (2002).
- [75] Hellermann, G. R., Nagy, S. B., Kong, X., Lockey, R. F. & Mohapatra, S. S. Mechanism of cigarette smoke condensate-induced acute inflammatory response in human bronchial epithelial cells, *Respir. Res.*, 22 (2002).
- [76] Hill, A., Gompertz, S. & Stockley, R. Factors influencing airway inflammation in chronic obstructive pulmonary disease, *Thorax* **11**, 970–977 (2000).
- [77] Hovenberg, H. W., Carlstedt, I. & Davies, J. R. Mucus glycoproteins in bovine trachea: identification of the major mucin populations in respiratory secretions and investigation of their tissue origins, *Biochem. J.*, 117–123 (1997).
- [77a] Ierodiasconou, D., Zanobetti, A., Coull, B.A. *et al.* Ambient air pollution, lung function, and airway responsiveness in asthmatic children. *J Allergy Clin Immunol.* **137(2)**:390-9 (2016).
- [77b] Ingebringtsen, T.S., Marott, J.L., Nordestgaard, B.G. *et al.* Statin use and exacerbations in individuals with chronic obstructive respiratory disease. *Thorax* **70**, 33- 40 (2015).
- [78] Iwamoto, I., Nadel, J. A., Varsano, S. & Forsberg, L. S. Turnover of cell-surface macromolecules in cultured dog tracheal epithelial cells, *Biochim Biophys Acta.* **3**, 336-46 (1988).
- [79] Jeffery, P. K. Morphologic features of airway surface epithelial cells and glands. In: Wagner, U. Studien zur trachealen Muzinsekretion und Morphologie nativ sowie nach SO₂- und NO₂-induzierter Tracheobronchitis am Rattenmodell, Habilitation, Philipps-Universität Marburg (1996).
- [80] Jeffery, P. K. Morphologic features of airway surface epithelial cells and glands, *Am. Rev. Respir. Dis.* **2 Pt 2**, S14-20 (1983).
- [81] Jeffery, P. K. The origins of secretions in the lower respiratory tract, *European journal of respiratory diseases. Supplement*, 34–42 (1987).
- [82] Jeffery, P. K. The Development of Large and Small Airways *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **5**, S174-S180 (1998).
- [83] Jeffery, P. K. Differences and similarities between chronic obstructive pulmonary disease and asthma, *Clin. Exp. Allergy*, 14–26 (1999).

- [83a] Ji, X., Han, M., Yun, Y. Acute nitrogen dioxide (NO₂) exposure enhances airway inflammation via modulating Th1/Th2 differentiation and activating JAK-STAT pathway. *Chemosphere* **120**, 722-728 (2015).
- [83b] Jones, B., Donovan, C., Liu, G. *et al.* Animal models of COPD: What do they tell us? *Respirology* **22**(1), 21-32 (2017).
- [84] Keane, M. P. & Strieter, R. M. The importance of balanced pro-inflammatory and anti-inflammatory mechanisms in diffuse lung disease, *Respir. Res.*, 5 (2002).
- [85] Keatings, V. M., Collins, P. D., Scott, D. M. & Barnes, P. J. Differences in interleukin-8 and tumor necrosis factor-alpha in induced sputum from patients with chronic obstructive pulmonary disease or asthma, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **2**, 530–534 (1996).
- [86] Kelley, J. Cytokines of the lung, *Am. Rev. Respir. Dis.* **3**, 765–788 (1990).
- [87] Kelly, F. J., Blomberg, A., Frew, A., Holgate, S. T. & Sandstrom, T. Antioxidant Kinetics in Lung Lavage Fluid following Exposure of Humans to Nitrogen Dioxide, *Am J Respir Crit Care Med*, 1700-1705 (1996).
- [87a] Kesic, M.J., Meyer, M., Bauer, R. *et al.* Exposure to ozone modulates human airway protease/ antiprotease balance contributing to increased influenza A infection, *PloS One* **7** (4), e35108 (2012).
- [88] Khawaja, A. M., Liu, Y. C. & Rogers, D. F. Effect of fenspiride, a non-steroidal antiinflammatory agent, on neurogenic mucus secretion in ferret trachea in vitro, *Pulmonary pharmacology & therapeutics* **6**, 363–368 (1999).
- [89] Kim, K. C., Opaskar-Hincman, H. & Bhaskar, K. R. Secretions from primary hamster tracheal surface epithelial cells in culture: mucin-like glycoproteins, proteoglycans, and lipids, *Exp. Lung Res.* **2**, 299–314 (1989).
- [90] Kim, V., Rogers, T. J. & Criner, G. J. New concepts in the pathobiology of chronic obstructive pulmonary disease, *Proceedings of the American Thoracic Society* **4**, 478–485 (2008).
- [90a] Kim, V., Han, M.K., Vance, G.B. *et al.* COPDGene Investigators. The chronic bronchitic phenotype of COPD: an analysis of the COPDGene study, *Chest* **140**, 626-633 (2011).
- [91] Klapproth, H., Racké, K. & Wessler, I. Acetylcholine and nicotine stimulate the release of granulocyte-macrophage colony stimulating factor from cultured human bronchial epithelial cells, *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* **4**, 472–475 (1998).

-
- [91a] Ko, F.W., Hoi, D.S. Air pollution and chronic obstructive pulmonary disease, *Respirology*. **17**, 395-401 (2012).
- [91b] Kruskal, W.H. & Wallis, W.A. Use of ranks in one-criterion variance analysis. *J. Amer. Stat. Ass.* 47, pp.583-621 und 48 (1953), pp. 907-911 (1952).
- [92] Kubota, K., Murakami, M., Takenaka, S. *et al.* Effects of Long-Term Nitrogen Dioxide Exposure on Rat Lung: Morphological Observations, *Environmental Health Perspectives*, 157-169 (1987).
- [93] Lacy, P., Lee, J. L. & Vethanayagam, D. Sputum analysis in diagnosis and management of obstructive airway diseases, *Therapeutics and clinical risk management* **3**, 169–179 (2005).
- [93a] Lee, J.A. , Kim H.J., Kim Y.H. The effectiveness of anti-leukotriene agents in patients with COPD: a systematic review and meta-analysis, *Lung* **193**, 477-486 (2014).
- [94] Lei, X. F., Ohkawara, Y., Stämpfli, M. R. *et al.* Compartmentalized transgene expression of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) in mouse lung enhances allergic airways inflammation, *Clin. Exp. Immunol.* **2**, **157–165** (1998).
- [95] Leikauf, G. D., Borchers, M. T., Prows, D. R. & Simpson, L. G. Mucin apoprotein expression in COPD, *Chest* **5 Suppl**, 166S-182S (2002).
- [96] Levine, S. J. Bronchial epithelial cell-cytokine interactions in airway inflammation, *J. Investig. Med.* **3**, 241–249 (1995).
- [97] Lopez, A. D. & Murray, C. C. The global burden of disease, 1990-2020, *Nat. Med.* **11**, 1241–1243 (1998).
- [98] Lopez, A. D., Mathers, C. D., Ezzati, M. *et al.* Global and regional burden of disease and risk factors, 2001: systematic analysis of population health data, *Lancet*, 1747–57 (2006).
- [98a] Lozano, R., Naghavi, N., Foreman, K. *et al.* Global and regional mortality from 235 causes of death 20 age groups in 1990-2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010, *Lancet* **380**, 2095-2128 (2012).
- [98b] Lunge und Gesundheit in Europa. Fakten und Zahlen, URL: [www.sdgp.de/fileadmin/oneumologie/downloads/Aktuelles/2014/WBL_Zahlen_und FaktenAnsichtsexemplar_fuer_DGP_intern.pdf?cntmark](http://www.sdgp.de/fileadmin/oneumologie/downloads/Aktuelles/2014/WBL_Zahlen_und_FaktenAnsichtsexemplar_fuer_DGP_intern.pdf?cntmark) (Abrufdatum: 30.01.2019).
- [99] MacNee, W. Oxidants/antioxidants and COPD, *Chest* **5 Suppl 1**, 303S-17S (2000).

- [100] MacNee, W. Oxidative stress and lung inflammation in airways disease, *Eur. J. Pharmacol.* **1-3**, 195–207 (2001).
- [101] MacNee, W. & Rahman, I. Is oxidative stress central to the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease?, *Trends in molecular medicine* **2**, 55–62 (2001).
- [102] Madison, J. M. & Irwin, R. S. Chronic obstructive pulmonary disease, *Lancet* **9126**, 467–473 (1998).
- [103] Maestrelli, P., Saetta, M., Mapp, C. E. & Fabbri, L. M. Remodeling in response to infection and injury. Airway inflammation and hypersecretion of mucus in smoking subjects with chronic obstructive pulmonary disease, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **10 Pt 2**, S76-80 (2001).
- [103c] Mand, C. Der Effekt von Infliximab auf TNF- α -induzierte Mucin-Sekretion in humanen Atemwegsepithelien, Inaugural-Dissertation, Philipps-Universität Marburg (2011).
- [104] Marin, M. G. Update: pharmacology of airway secretion, *Pharmacol. Rev.* **1**, 35–65 (1994).
- [105] Markewitz, B. A., Owens, M. W. & Payne, D. K. The pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease, *Am. J. Med. Sci.* **2**, 74–78 (1999).
- [106] McClure, B. J., Hercus, T. R., Cambareri, B. A. *et al.* Molecular assembly of the ternary granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor complex, *Blood* **4**, 1308–1315 (2003).
- [107] McManus, T. E., Marley, A. M., Baxter, N., Coyle, P. V., & Kidney, J. C. GM-CSF is elevated in COPD patients in comparison to non-obstructed smokers, *Proceedings of The American Thoracic Society*, A394 (2005).
- [108] Kempermann, U. M. Untersuchungen zur Bedeutung des Adenylat- und Phosphoinositolweges bei der Regulation der trachealen Muzinsekretion im Rattenmodell, Inaugural-Dissertation, Philipps-Universität Marburg (1999).
- [109] Merten, M. D. & Figarella, C. Neuropeptide Y and norepinephrine cooperatively inhibit human tracheal gland cell secretion, *Am. J. Physiol.* **5 Pt 1**, L513-8 (1994).
- [110] Metcalf, D. Transgenic mice as models of hemopoiesis, *Cancer* **10 Suppl**, 2695–2699 (1991).
- [111] Metcalf, D., Begley, C. G., Williamson D. J. *et al.* Hemopoietic responses in mice injected with purified recombinant murine GM-CSF, *Exp Hematol.* **1**, 1-9 (1987).

- [112] Metcalf, D., et al. (1999a). Aberrant hematopoiesis in mice with inactivation of the gene encoding SOCS-1. In: Vlahos, R., Bozinovski, S., Hamilton, J. A. & Anderson, G. P. Therapeutic potential of treating chronic obstructive pulmonary disease (COPD) by neutralising granulocyte macrophage-colony stimulating factor (GM-CSF), *Pharmacol. Ther.* **1**, 106–115 (2006).
- [113] Mikuniya, T., Nagai, S., Tsutsumi, T. *et al.* Proinflammatory or regulatory cytokines released from BALF macrophages of healthy smokers, *Respiration; international review of thoracic diseases* **5**, 419–426 (1999).
- [114] Mills, P. R., Davies, R. J. & Devalia, J. L. Airway epithelial cells, cytokines, and pollutants, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **5 Pt 2**, S38-43 (1999).
- [115] Minette, P. A. & Barnes, P. J. Muscarinic receptor subtypes in lung. Clinical implications, *Am Rev Respir Dis.* **3 Pt 2**, S162-5 (1990).
- [116] Müller, B., Seifart, C., Wichert, P. von & Barth, P. J. Adaptation of rat type II pneumocytes to NO₂: effects of NO₂ application mode on phosphatidylcholine metabolism, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **5**, 712–720 (1998).
- [117] Mullol, J., Baraniuk, J. N., Pitale, M. *et al.* Vasoactive intestinal peptide (VIP) induces IL-6 and IL-8, but not G-CSF and GM-CSF release from a human bronchial epithelial cell line, *Neuropeptides* **2**, 119–124 (1997).
- [117a] Murray, C.J. , Barber, R.M. *et al.* GBD 2013 DALYs and HALE Collaborators. Global , regionals and national disability-adjusted life years (DALYs) for 306 diseases and injuries and healthy life expectancy (HALE) for 188 countries, 1990-2013: quantifying the epidemiological transition, *Lancet* **386**, 10009 (2015).
- [118] Nadel, J. A. Role of neutrophil elastase in hypersecretion during COPD exacerbations, and proposed therapies, *Chest* **5 Suppl 2**, 386S-9S (2000).
- [119] Nadel, J. A. & Borson, D. B. Secretion and ion transport in airways during inflammation, *Biorheology* **6**, 541–549 (1987).
- [120] Nadel, J. A. & Davis, B. Parasympathetic and sympathetic regulation of secretion from submucosal glands in airways, *Fed. Proc.* **13**, 3075–3079 (1980).
- [121] Nagaki, M., Ishihara, H., Shimura, S. *et al.* Tachykinins induce a [Ca²⁺]i rise in the acinar cells of feline tracheal submucosal gland, *Respiration Physiology*, 111-120 (1994).
- [121a] Nie, Y.C., Wu, H., Li P.B. *et al.* Characteristic comparison of three rat models induced by cigarette smoke or combined with LPS: to establish a suitable model for

study of airway mucus hypersecretion in chronic obstructive pulmonary disease, *Pulm. Pharmacol. Ther.* **25**, 349-56 (2012).

[121b] Nopp, A., Johansson, S.G. Adedoyin, J. *et al.* After six years with xolair, a 3-year withdrawal follow up, *Allergy* **65**, 56-60 (2010).

[122] O'byrne, P. M. & Postma, D. S. The many faces of airway inflammation. Asthma and chronic obstructive pulmonary disease. Asthma Research Group, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **5 Pt 2**, S41-63 (1999).

[123] Ohta, K., Yamashita, Y., Tajim, M. *et al.* Diesel exhaust particulate induces airway hyperresponsiveness in a murine model: essential role of GM-CSF, *J. Allergy Clin. Immunol.* **5**, 1024–1030 (1999).

[124] Ohtsuka, R., Doi, K. & Itagaki, S. Histological characteristics of respiratory system in Brown Norway rat, *Exp. Anim.* **2**, 127–133 (1997).

[125] Paine, R., Morris, S. B., Jin H. *et al.* Impaired functional activity of alveolar macrophages from GM-CSF-deficient mice, *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* **5**, L1210-8 (2001).

[125a] Parajuli, B., Sonobe, Y., Kawanokuchi, J. *et al.* GM-CSF increases LPS-induced production of proinflammatory mediators via upregulation of TLR4 and CD14 in murine microglia, *J Neuroinflammation* **9**, 268 (2012).

[125b] Pascal, M., Corso, M., Chanel, O. *et al.* Assessing the public health impacts of urban air pollution in 25 European cities: Results of the Aphekom project, *Sci. Total Environ.* **449**, 390-400 (2013).

[126] Pauwels, R. A., Buist, A. S., Calverley, P. M., Jenkins, C. R. & Hurd, S. S. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease. NHLBI/WHO Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD) Workshop summary, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **5**, 1256–1276 (2001).

[127] Peatfield, A. C. & Richardson, P. S. Evidence for non-cholinergic, non-adrenergic nervous control of mucus secretion into the cat trachea, *J. Physiol. (Lond.)*, 335–345 (1983).

[128] Pettersen, C. A. & Adler, K. B. Airways inflammation and COPD: epithelial-neutrophil interactions, *Chest* **5 Suppl**, 142S-150S (2002).

[129] Phipps, R. J., Williams, I. P., Richardson, P. S. *et al.* Sympathomimetic drugs stimulate the output of secretory glycoproteins from human bronchi in vitro, *Clin Sci (Lond)* **1**, 23-8 (1982).

- [129a] Piper, E., Brightling, C., Niven, R. *et al.* A phase II placebo-controlled study of tralokinumab in moderate to severe asthma, *Eur Respir J*, 41, 330-8 (2013).
- [129b] Pleasants, R.A., Riley, I.L., Mannino, D.M. Defining and targeting health disparities in chronic obstructive pulmonary disease, *Int J Chron Ostruct Pulmon Dis* **11**, 2475-2496 (2016).
- [130] Profita, M., Chiappara, G., Mirabella, F. *et al.* Effect of cilomilast (Ariflo) on TNF-alpha, IL-8, and GM-CSF release by airway cells of patients with COPD, *Thorax* **7**, 573-579 (2003).
- [131] Ramnarine, S. I., Hirayama, Y., Barnes, P. J., Rogers, D. F. 'Sensory-efferent' neural control of mucus secretion: characterization using tachykinin receptor antagonists in ferret trachea in vitro, *Br J Pharmacol.* **4**, 1183-90 (1994).
- [132] Ramnarine, S. I., Haddad, E. B., Khawaja, A. M., Mak, J. C. & Rogers, D. F. On muscarinic control of neurogenic mucus secretion in ferret trachea, *J. Physiol. (Lond.)*, 577-586 (1996).
- [133] Ramnarine, S. I. & Rogers, D. F. Non-adrenergic, non-cholinergic neural control of mucus secretion in the airways, *Pulmonary pharmacology* **1**, 19-33 (1994).
- [133a] Rennard, S.I., Fogarty, C., Kelsen, S. *et al.* COPD Investigators. The safety and efficacy of infliximab in moderate to severe chronic obstructive pulmonary disease, *Am J Respir Crit Care Med* **175**, 926-934 (2007).
- [134] Repine, J. E., Bast, A. & Lankhorst, I. Oxidative stress in chronic obstructive pulmonary disease. Oxidative Stress Study Group, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **156**, 341-357 (1997).
- [135] Rha, K. S., Majima, Y., Sakakura, Y. *et al.* Distribution of substance P immunoreactive nerve fibers in the tracheal submucosal gland of cats, *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.* **3**, 222-226 (1994).
- [136] Rogers, D. F. Airway goblet cells: responsive and adaptable front-line defenders, *Eur. Respir. J.* **9**, 1690-1706 (1994).
- [137] Rogers, D. F. Neurokinin receptors subserving airways secretion, *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **7**, 932-939 (1995).
- [138] Rogers, D. F. In vivo preclinical test models for studying airway mucus secretion, *Pulmonary pharmacology & therapeutics* **3**, 121-128 (1997).
- [139] Rogers, D. F. The airway goblet cell, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **1**, 1-6 (2003).

-
- [140] Rogers, D. F. & Dewar, A. Neural control of airway mucus secretion, *Biomed. Pharmacother.* **9**, 447–453 (1990).
- [141] Rose, M. C. Mucins: structure, function, and role in pulmonary diseases, *Am J Physiol.* **4 Pt 1**, L413-29 (1992).
- [142] Rose, M. C., Nickola, T. J. & Voynow, J. A. Airway mucus obstruction: mucin glycoproteins, MUC gene regulation and goblet cell hyperplasia, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **5**, 533–537 (2001).
- [143] Rose, M. C. & Voynow, J. A. Respiratory tract mucin genes and mucin glycoproteins in health and disease, *Physiol. Rev.* **1**, 245–278 (2006).
- [144] Roussel, P., Lamblin, G., Lhermitte, M. *et al.* The complexity of mucins, *Biochimie* **11**, 1471–1482 (1988).
- [144a] Rycroft, C.E., Heyes, A., Lanza, L. *et al.* Epidemiology of chronic obstructive pulmonary disease: a literature review. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis* **7**, 457-494 (2012).
- [144b] Sachs, L. *Angewandte Statistik*, Springer 11. Auflage, Kapitel 422 (2003).
- [145] Saetta, M., Di Stefano, A., Turato, G. *et al.* CD8+ T-lymphocytes in peripheral airways of smokers with chronic obstructive pulmonary disease, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **157**, 822–826 (1998).
- [146] Saetta, M., Turato G., Facchini F. M. *et al.* Inflammatory cells in the bronchial glands of smokers with chronic bronchitis, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **5**, 1633–1639 (1997).
- [147] Sagai, M., Ichinose, T., Oda, H. & Kubota, K. Studies on biochemical effects of nitrogen dioxide. II. Changes of the protective systems in rat lungs and of lipid peroxidation by acute exposure, *Journal of toxicology and environmental health* **1**, 153–164 (1982).
- [147a] Schaich, E., Hamerle A. *Verteilungsfreie stat. Prüfverfahren*. Springer (1984).
- [147b] Schikowski, T., Mills, I.C., Anderson, H.R. *et al.* Ambient air pollution: a cause of COPD? *Eur. Respir. J.* **43 (1)**, 250-263 (2014).
- [147c] Schnell, I., Potchter, O., Vaakov, Y., Epstein, Y. Human exposure to environmental health concern by types of urban environment: the case of Tel Aviv, *Environ pollut* **208** (Pt a): 58-65 (2016).
- [148] Shapiro, S. D. Animal models for COPD, *Chest* **5 Suppl 1**, 223S-7S (2000).

- [149] Sherwin, R. P. & Richters, V. Hyperplasia of Type 2 pneumocytes following 0.34 ppm nitrogen dioxide exposure: quantitation by image analysis. *Arch Environ Health*. **5**, 306-15 (1982).
- [150] Shim, J. J., Dabbagh, K., Ueki I. F. *et al.* IL-13 induces mucin production by stimulating epidermal growth factor receptors and by activating neutrophils, *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* **1**, L134-40 (2001).
- [151] Shibata, Y., Berclaz, P. Y., Chroneos, Z. C. *et al.* GM-CSF regulates alveolar macrophage differentiation and innate immunity in the lung through PU.1, *Immunity* **4**, 557-67 (2001).
- [152] Shimura, S., Sasaki, T., Okayama, H. *et al.* Effect of substance P on mucus secretion of isolated submucosal gland from feline trachea, *J Appl Physiol.* **2**, 646-53 (1987).
- [152a] Siegel and Castellan. Non parametric statistics for the behavioural sciences. *MacGraw Hill Int., New York.*, pp 213-214 (1988).
- [153] Smith, S. M., Lee, D. K., Lacy, J. & Coleman, D. L. Rat tracheal epithelial cells produce granulocyte/macrophage colony-stimulating factor, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **1**, 59–68 (1990).
- [154] Sommerhoff C. P., Fang, K. C., Nadel, J. A. *et al.* Classical second messengers are not involved in proteinase-induced degranulation of airway gland cells, *Am. J. Physiol.*, L796-L803 (1996).
- [154a] Staats, P., Krohm, I., Heimann, S. *et al.* Sekretagoge Effekte von GM-CSF in einem Rattenmodell der COPD sowie der humanen trachealen Drüsenzelllinie MM39, *Pneumologie* **56** (S1), S84, P148 (2002).
- [154b] Steppuhn, H., Kuhnert, R., Scheidt-Nave, C. 12-Monats-Prävalenz der bekannten chronisch obstruktiven Lungenerkrankung (COPD) in Deutschland, *Journal of Health Monitoring* **2** (3), 46-54 (2017).
- [155] Stretton, D. Non-adrenergic, non-cholinergic neural control of the airways, *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **10**, 675–684 (1991).
- [156] Strous, G. J. & Dekker, J. Mucin-type glycoproteins, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **1-2**, 57–92 (1992).
- [157] Svitacheva, N. & Davies, J. R. Mucin biosynthesis and secretion in tracheal epithelial cells in primary culture, *Biochem. J.* **Pt 1**, 23–32 (2001).

- [158] Takeyama, K., Dabbagh, K., Shim, J. J. *et al.* Oxidative stress causes mucin synthesis via transactivation of epidermal growth factor receptor: role of neutrophils, *J. Immunol.* **3**, 1546–1552 (2000).
- [158a] Tian, P.W., Wen, F.Q. Clinical significance of airway mucus hypersecretion in chronic obstructive pulmonary disease, *J Tranl Int Med* **3(3)**, 89-92 (2015).
- [159] Tsoumakidou M., Tzanakis, N., Chrysafakis G. *et al.* Nitrosative Stress, Heme Oxygenase-1 Expression and Airway Inflammation During Severe Exacerbations of COPD, *Chest.* **6**, 1911-8 (2005).
- [160] Turato, G., Zuin, R. & Saetta, M. Pathogenesis and pathology of COPD, *Respiration; international review of thoracic diseases* **2**, 117–128 (2001).
- [161] Turlej, R. K., Fiévez, L., Sandersen, C. F. *et al.* Enhanced survival of lung granulocytes in an animal model of asthma: evidence for a role of GM-CSF activated STAT5 signalling pathway, *Thorax* **9**, 696–702 (2001).
- [162] USSING, H. H. & ZERAHN, K. Active transport of sodium as the source of electric current in the short-circuited isolated frog skin, *Acta Physiol. Scand.* **2-3**, 110–127 (1951).
- [162a] van de Laar, L., Coffey, P.J., Woltman A.M. Regulation of dendritic cell development by GM-CSF: molecular control and implications for immune homeostasis and therapy, *Blood* **119**, 3393-93 (2012).
- [163] van der Velden, V. H. & Hulsmann, A. R. Autonomic innervation of human airways: structure, function, and pathophysiology in asthma, *Neuroimmunomodulation* **3**, 145–159 (1999).
- [164] Velsor, L. W. & Postlethwait, E. M. NO₂-induced generation of extracellular reactive oxygen is mediated by epithelial lining layer antioxidants, *Am. J. Physiol.* **6 Pt 1**, L1265-75 (1997).
- [164a] Vestbo, J. COPD: Definition and phenotypes. *Clin Chest Med.* **35 (1)**, 1-6 (2014).
- [164b] Vestbo, J., Prescott, E., Lange, E. Association of chronic mucus hypersecretion with FEV1 decline and chronic obstructive pulmonary disease morbidity, *Am J Respir Crit Care Med* **153**, 1530-5 (1996).
- [165] Vlahos, R., Bozinovski, S., Hamilton, J., Irving, L., & Anderson, G. (2005a). GM-CSF is a key pathogenic mediator in experimental COPD. In: Vlahos, R., Bozinovski, S., Hamilton, J. A. & Anderson, G. P. Therapeutic potential of treating chronic

obstructive pulmonary disease (COPD) by neutralising granulocyte macrophage-colony stimulating factor (GM-CSF), *Pharmacol. Ther.* **1**, 106–115 (2006).

[166] Vlahos, R., Bozinovski, S., Irving, L., Smallwood, D. M., Hamilton, J. A., & Anderson, G. P. (2005b). GM-CSF is a pathogenic mediator in experimental COPD. In: Vlahos, R., Bozinovski, S., Hamilton, J. A. & Anderson, G. P. Therapeutic potential of treating chronic obstructive pulmonary disease (COPD) by neutralising granulocyte macrophage-colony stimulating factor (GM-CSF), *Pharmacol. Ther.* **1**, 106–115 (2006).

[167] Vlahos, R., Bozinovski, S., Hamilton, J. A. & Anderson, G. P. Therapeutic potential of treating chronic obstructive pulmonary disease (COPD) by neutralising granulocyte macrophage-colony stimulating factor (GM-CSF), *Pharmacol. Ther.* **1**, 106–115 (2006).

[167a] Vlahos, R., Bozinovski, S., Chan, S.P. *et al.* Neutralizing granulocyte/macrophage colony-stimulating factor inhibits cigarette smoke-induced lung inflammation, *Am J Respir Crit Care Med* **182**, 34-40 (2010).

[168] Vogelmeier, C., Buhl, R., Criée C. P. *et al.* [Guidelines for the diagnosis and therapie of COPD issued by Deutsche Atemwegsliga and Deutsche Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin], *Pneumologie* **61**, e1-e40 (2007).

[168a] Vogelmeier, C., Buhl, R., Burghuber, O. *et al.* [Guidelines for the diagnosis and therapie of COPD issued by the German Respiratory Society and the German Atemwegsliga in Cooperation with the Austrian Society of Pneumology], *Pneumologie* **72**, 253-308 (2018).

[169] Voynow, J. A., Gendler, S. J. & Rose, M. C. Regulation of mucin genes in chronic inflammatory airway diseases, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **6**, 661–665 (2006).

[169a] Wacker, M.E., Jorres, R. A., Schulz, H. *et al.* Direct and indirect costs of COPD and ist comorbidities: Results from the German COSYCONET study. *Respir Med* **111**, 39-46 (2016).

[170] Wagner, U., Barth, P. J., Bredenbröcker, D., Haase, H., Locher, A., Janßen, P., Yu, F., von Wichert, P. Untersuchungen zur Quantifizierung der durch NO₂- und SO₂-Exposition modulierten trachealen Muzinsekretion, der tracheobronchialen Epithelproliferation sowie der begleitenden Lungenparenchymveränderungen, *KfK-PUG-Bericht 16 des Kernforschungszentrums Karlsruhe GmbH*, 11-73 (1994).

[171] Wagner, U., Fehmann H.-C., Bredenbröcker, D. *et al.* Effects of selective tachykinin-receptor antagonists on tachykinin-induced airway mucus secretion in the rat, *Neuropeptides* **1**, 55–61 (1999).

-
- [172] Wagner, U., Staats, P., Fehmann H.-C. *et al.* Analysis of airway secretions in a model of sulfur dioxide induced chronic obstructive pulmonary disease (COPD), *Journal of occupational medicine and toxicology* **1**:12 (2006).
- [173] Wagner, U. Persönliche Mitteilungen; Unveröffentlichte Rohdaten. Philipps-Universität Marburg, Fachbereich Medizin
- [174] Wagner, U. Studien zur trachealen Muzinsekretion und Morphologie nativ sowie nach SO₂- und NO₂-induzierter Tracheobronchitis am Rattenmodell, Habilitation, Philipps-Universität Marburg (1996).
- [175] Wang, J., Snider, D. P., Hewlett, B. R. *et al.* Transgenic expression of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor induces the differentiation and activation of a novel dendritic cell population in the lung, *Blood* **7**, 2337–2345 (2000).
- [176] Wang, K., Wen, F.-q. & Xu, D. Mucus hypersecretion in the airway, *Chin. Med. J.* **7**, 649–652 (2008).
- [176a] Wang, S., Xiong, L., Deng, X. *et al.* [Effects of simvastatin on airway inflammation and airway mucus hypersecretions in rats with chronic obstructive pulmonary disease], *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* **95** (22), 1726-30 (2015).
- [177] Webber, S. E. & Widdicombe, J. G. The effect of vasoactive intestinal peptide on smooth muscle tone and mucus secretion from the ferret trachea, *Br. J. Pharmac.*, 139-148 (1987).
- [178] Welte, T. [Cytokines and obstructive respiratory tract diseases], *Der Internist* **1**, 64–74 (2001).
- [179] White, M. V. Muscarinic receptors in human airways, *J. Allergy Clin. Immunol.* **5 Pt 2**, 1065–1068 (1995).
- [180] Widdicombe, J. G. Autonomic regulation. i-NANC/e-NANC, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **5 Pt 3**, S171-5 (1998).
- [181] Widdicombe, J. H., Chen, L. L.-K., Sporer, H. *et al.* Distribution of tracheal and laryngeal mucous glands in some rodents and the rabbit, *J. Anat.* **Pt 2**, 207-221 (2001).
- [182] Widdicombe, J. H. Neurophysiology of the cough reflex, *Eur Respir J* **7**, 1193–1202 (1995).
- [183] Williams, O. W., Sharafkhaneh, A., Kim, V., Dickey, B. F. & Evans, C. M. Airway mucus: From production to secretion, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **5**, 527–536 (2006).
- [184] Wollin, L., Uhlig, S., Nüsing, R. & Wendel, A. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor amplifies lipopolysaccharide-induced bronchoconstriction by a

neutrophil- and cyclooxygenase 2-dependent mechanism, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **2**, 443–450 (2001).

[184a] World Health Organization: The top 10 causes of death. 24.Mai 2018, URL: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death> (Abrufdatum: 30.01.2019).

[184b] World Health Organization: Global Health Estimates 2016: Estimated deaths by cause and region, 2000 and 2016, URL: https://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease_/GHE2016_Deaths_WBInc_2000_2016.xls (Abrufdatum: 30.01.2019).

[184c] World Health Organization: Chronic obstructive pulmonary disease (COPD). 1. December 2017, URL: [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chronic-obstructive-pulmonary-disease-\(copd\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chronic-obstructive-pulmonary-disease-(copd)) (Abrufdatum: 30.01.2019).

[184d] World Health Organization: Ambient (outdoor) air quality and health, URL: [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/ambient-\(outdoor\)-quality-and-health](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/ambient-(outdoor)-quality-and-health) (Abrufdatum: 30.01.2019).

[185] Wright, J. L., Cosio, M. & Churg, A. Animal models of chronic obstructive pulmonary disease, *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* **1**, L1-15 (2008).

[186] Xing, Z., Braciak, T., Ohkawara, Y. *et al.* Gene transfer for cytokine functional studies in the lung: the multifunctional role of GM-CSF in pulmonary inflammation, *J. Leukoc. Biol.* **4**, 481–488 (1996).

[187] Xing, Z., Ohkawara, Y., Jordana, M., Graham, F. & Gauldie, J. Transfer of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor gene to rat lung induces eosinophilia, monocytosis, and fibrotic reactions, *J. Clin. Invest.* **4**, 1102–1110 (1996).

[188] Yoshida, T. & Tuder, R. M. Pathobiology of cigarette smoke-induced chronic obstructive pulmonary disease, *Physiol. Rev.* **3**, 1047–1082 (2007).

[189] Yousefi, S., Cooper, P. R., Mueck, B., Potter, S. L. & Jarai, G. cDNA representational difference analysis of human neutrophils stimulated by GM-CSF, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2**, 401–409 (2000).

[190] Ziora, D., Dworniczak, S., Kaczmarczyk, G. *et al.* Correlation of exhaled nitric oxide with nitrogen oxides and selected cytokines in induced sputum of chronic obstructive pulmonary disease patients, *J. Physiol. Pharmacol.* **Pt 2**, 791–799 (2007).

[191] Zweiundzwanzigste Verordnung zur Durchführung des Bundes-Immissionsschutzgesetzes (Verordnung über Immissionswerte für Schadstoffe in der Luft – 22. BImSchV) in der Fassung vom 4. Juni 2007 (BGBl. I S. 1006).

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1	Mediatoren der COPD	12
Tabelle 1.2	Klassifikation humaner Muzine	28
Tabelle 2.1	Lösungszusammensetzungen	39
Tabelle 2.2	Geräte und Zubehör.....	39
Tabelle 2.3	F344-Ratten.....	40
Tabelle 2.4	SD-Ratten.....	40
Tabelle 3.1	Basale und ACh-stimulierte Muzinsekretion der nativen Fischerrattentrachea in vitro	51
Tabelle 3.2	Basale und ACh-stimulierte Muzinsekretion der Fischerrattentrachea in vitro nach 1-tägiger Exposition gegenüber 10 ppm NO ₂	51
Tabelle 3.3	Basale und ACh-stimulierte Muzinsekretion der Fischerrattentrachea in vitro nach 3-tägiger Exposition gegenüber 10 ppm NO ₂	51
Tabelle 3.4	Basale und ACh-stimulierte Muzinsekretion der Fischerrattentrachea in vitro nach 20-tägiger Exposition gegenüber 10 ppm NO ₂	52
Tabelle 3.5	Basale und ACh-stimulierte Muzinsekretion der nativen SD-Ratten- Trachea in vitro.....	53
Tabelle 3.6	Basale und ACh-stimulierte Muzinsekretion der SD-Ratten-Trachea in vitro nach 1-tägiger Exposition gegenüber 10 ppm NO ₂	54
Tabelle 3.7	Basale und ACh-stimulierte Muzinsekretion der SD-Ratten-Trachea in vitro nach 2-tägiger Exposition gegenüber 10 ppm NO ₂	54
Tabelle 3.8	Basale und ACh-stimulierte Muzinsekretion der SD-Ratten-Trachea in vitro nach 3-tägiger Exposition gegenüber 10 ppm NO ₂	54
Tabelle 3.9	Basale und ACh-stimulierte Muzinsekretion der SD-Ratten-Trachea in vitro nach 20-tägiger Exposition gegenüber 10 ppm NO ₂	54
Tabelle 3.10	Basale und ACh-stimulierte Muzinsekretion der SD-Ratten-Trachea in vitro nach 28-tägiger Exposition gegenüber 10 ppm NO ₂	55
Tabelle 3.11	Basale und SP-stimulierte Muzinsekretion der nativen Fischerrattentrachea in vitro	59
Tabelle 3.12	Basale und SP-stimulierte Muzinsekretion der Fischerrattentrachea in vitro nach 1-tägiger Exposition gegenüber 10 ppm NO ₂	59
Tabelle 3.13	Basale und SP-stimulierte Muzinsekretion der Fischerrattentrachea in vitro nach 3-tägiger Exposition gegenüber 10 ppm NO ₂	60
Tabelle 3.14	Basale und SP-stimulierte Muzinsekretion der Fischerrattentrachea in vitro nach 20-tägiger Exposition gegenüber 10 ppm NO ₂	60
Tabelle 3.15	Basale und SP-stimulierte Muzinsekretion der nativen SD-Ratten- Trachea in vitro.....	61
Tabelle 3.16	Basale und SP-stimulierte Muzinsekretion der SD-Ratten-Trachea in	

vitro nach 3-tägiger Exposition gegenüber 10 ppm NO ₂	61
Tabelle 3.17 Basale und SP-stimulierte Muzinsekretion der SD-Ratten-Trachea in vitro nach 20-tägiger Exposition gegenüber 10 ppm NO ₂	62
Tabelle 3.18 Basale und GM-CSF (0,01 ng/ml) -stimulierte Muzinsekretion der nativen Fischerrattentrachea in vitro	64
Tabelle 3.19 Basale und GM-CSF (0,05 ng/ml) -stimulierte Muzinsekretion der nativen Fischerrattentrachea in vitro	65
Tabelle 3.20 Basale und GM-CSF (0,1 ng/ml) -stimulierte Muzinsekretion der nativen Fischerrattentrachea in vitro	65
Tabelle 3.21 Basale und GM-CSF (0,15 ng/ml) -stimulierte Muzinsekretion der nativen Fischerrattentrachea in vitro	65
Tabelle 3.22 Basale und GM-CSF (0,2 ng/ml) -stimulierte Muzinsekretion der nativen Fischerrattentrachea in vitro	65
Tabelle 3.23 Basale und GM-CSF (0,4 ng/ml) -stimulierte Muzinsekretion der nativen Fischerrattentrachea in vitro	66
Tabelle 3.24 Basale und GM-CSF (1,0 ng/ml) -stimulierte Muzinsekretion der nativen Fischerrattentrachea in vitro	66
Tabelle 3.25 Basale und GM-CSF (0,05 ng/ml)-stimulierte Muzinsekretion der Fischerrattentrachea in vitro nach 1-tägiger Exposition gegenüber 10 ppm NO ₂	67
Tabelle 3.26 Basale und GM-CSF (0,05 ng/ml)-stimulierte Muzinsekretion der Fischerrattentrachea in vitro nach 3-tägiger Exposition gegenüber 10 ppm NO ₂	67
Tabelle 3.27 Basale und GM-CSF (0,05 ng/ml)-stimulierte Muzinsekretion der Fischerrattentrachea in vitro nach 20-tägiger Exposition gegenüber 10 ppm NO ₂	68
Tabelle 3.28 Basale und GM-CSF (0,1 ng/ml)-stimulierte Muzinsekretion der Fischerrattentrachea in vitro nach 1-tägiger Exposition gegenüber 10 ppm NO ₂	68
Tabelle 3.29 Basale und GM-CSF (0,1 ng/ml)-stimulierte Muzinsekretion der Fischerrattentrachea in vitro nach 3-tägiger Exposition gegenüber 10 ppm NO ₂	68
Tabelle 3.30 Basale und GM-CSF (0,1 ng/ml)-stimulierte Muzinsekretion der Fischerrattentrachea in vitro nach 20-tägiger Exposition gegenüber 10 ppm NO ₂	68
Tabelle 3.31 Basale und GM-CSF (0,15 ng/ml)-stimulierte Muzinsekretion der Fischerrattentrachea in vitro nach 1-tägiger Exposition gegenüber 10 ppm NO ₂	69
Tabelle 3.32 Basale und GM-CSF (0,15 ng/ml)-stimulierte Muzinsekretion der Fischerrattentrachea in vitro nach 3-tägiger Exposition gegenüber	

10 ppm NO ₂	69
Tabelle 3.33 Basale und GM-CSF (0,15 ng/ml)-stimulierte Muzinsekretion der Fischerrattentrachea in vitro nach 20-tägiger Exposition gegenüber 10 ppm NO ₂	69
Tabelle 3.34 Basale und GM-CSF (0,2 ng/ml)-stimulierte Muzinsekretion der Fischerrattentrachea in vitro nach 1-tägiger Exposition gegenüber 10 ppm NO ₂	69
Tabelle 3.35 Basale und GM-CSF (0,2 ng/ml)-stimulierte Muzinsekretion der Fischerrattentrachea in vitro nach 3-tägiger Exposition gegenüber 10 ppm NO ₂	70
Tabelle 3.36 Basale und GM-CSF (0,2 ng/ml)-stimulierte Muzinsekretion der Fischerrattentrachea in vitro nach 20-tägiger Exposition gegenüber 10 ppm NO ₂	70
Tabelle 3.37 Basale und GM-CSF (0,4 ng/ml)-stimulierte Muzinsekretion der Fischerrattentrachea in vitro nach 1-tägiger Exposition gegenüber 10 ppm NO ₂	70
Tabelle 3.38 Basale und GM-CSF (0,4 ng/ml)-stimulierte Muzinsekretion der Fischerrattentrachea in vitro nach 3-tägiger Exposition gegenüber 10 ppm NO ₂	70
Tabelle 3.39 Basale und GM-CSF (0,4 ng/ml)-stimulierte Muzinsekretion der Fischerrattentrachea in vitro nach 20-tägiger Exposition gegenüber 10 ppm NO ₂	71
Tabelle 3.40 Basale und SP-stimulierte Muzinsekretion der Fischerrattentrachea in vitro nach 20-tägiger Exposition gegenüber 10 ppm NO ₂	74
Tabelle 3.41 Basale und GM-CSF-stimulierte Muzinsekretion der Fischerrattentrachea in vitro nach 20-tägiger Exposition gegenüber 10 ppm NO ₂	74
Tabelle 3.42 Basale und SP (1 µM)/ GM-CSF(0,2 ng/ml)-stimulierte Muzinsekretion der Fischerrattentrachea in vitro nach 20-tägiger Exposition gegenüber 10 ppm NO ₂	75

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1 Mögliche relevante Schlüsselaktionen von GM-CSF bei der COPD [167 *].....	19
Abbildung 2.1 Schematische Darstellung der Ussing-Kammer-Technik [174]	42
Abbildung 3.1 Basale und ACh-stimulierte Muzinsekretion der Fischerrattentrachea in vitro nach 1-, 3- und 20- tägiger Exposition gegenüber 10 ppm NO ₂ im Vergleich zu Kontrolltieren.....	52
Abbildung 3.2 Basale und ACh-stimulierte Muzinsekretion der SD-Ratten-Trachea in vitro nach 1-, 2-, 3-, 20- und 28- tägiger Exposition gegenüber 10 ppm NO ₂ im Vergleich zu Kontrolltieren	55
Abbildung 3.3 Basalsekretion der Fischer- und SD-Ratten-Trachea in vitro nach 1-, 3-, und 20-Tages-Exposition gegenüber 10 ppm NO ₂ im Vergleich zu Kontrolltieren	57
Abbildung 3.4 Basale und SP-stimulierte Muzinsekretion der Fischerrattentrachea in vitro nach 1-, 3- und 20- tägiger Exposition gegenüber 10 ppm NO ₂ im Vergleich zu Kontrolltieren	60
Abbildung 3.5 Basale und SP-stimulierte Muzinsekretion der SD-Ratten-Trachea in vitro nach 3- und 20- tägiger Exposition gegenüber 10 ppm NO ₂ im Vergleich zu Kontrolltieren	62
Abbildung 3.6 Sekretionsraten nach SP (1 µM)-Stimulation der Fischer- und SD- Ratten-Trachea in vitro nach 3- und 20- Tages-Exposition gegenüber 10 ppm NO ₂ im Vergleich zu Kontrolltieren	63
Abbildung 3.7 GM-CSF-stimulierte Muzinsekretion der nativen Fischerrattentrachea in vitro	66
Abbildung 3.8 GM-CSF-stimulierte Muzinsekretion der Fischerrattentrachea in vitro nach 1-, 3- und 20-tägiger Exposition gegenüber 10 ppm NO ₂ im Vergleich zu Kontrolltieren	71
Abbildung 3.9 GM-CSF-stimulierte Muzinsekretion der Fischerrattentrachea in vitro nach 20-tägiger Exposition gegenüber 10 ppm NO ₂	73
Abbildung 3.10 Sekretionsrate der SP- und GM-CSF- Stimulation der Fischerrattentrachea in vitro nach alleiniger Gabe und in Kombination nach 20-tägiger Exposition gegenüber 10 ppm NO ₂	75
Abbildung 4.1 Signaltransduktion (Interventionsmöglichkeiten für die therapeutische Inhibition von GM-CSF in vivo) [167*].....	109

A Anhang

A.1 Statistik

BOX-PLOT [71c]

Ein Box-Plot ist die übersichtliche Darstellung der Verteilung einer Variablen.

Dabei werden die Realisationen des Datensatzes $(x_i)_{i=1}^n$ der Reihe nach geordnet. Der i -te größte Wert, abgekürzt mit $x_{<i>}$ wird auch als i -te Ordnungsgröße des Samples bezeichnet.

Nun werden folgende Größen definiert:

Der Median x_m mit

$$x_m = \begin{cases} x_{<\frac{n+1}{2}>} & \text{wenn } n \text{ ungerade} \\ \frac{1}{2}(x_{<\frac{n}{2}>} + x_{<\frac{n}{2}+1>}) & \text{wenn } n \text{ gerade ist} \end{cases}$$

Der Median teilt den Datensatz im Anteil von 50% auf, d.h. die Hälfte der Daten ist kleiner oder gleich dem Median, die andere Hälfte größer oder gleich diesem Wert.

Weiter werden der untere hinge h_L und der obere hinge h_U mit Hilfe der Größe $s = \left(\left[\frac{n+1}{2}\right] + 1\right) / 2$ wie folgt bestimmt: (Dabei ist der Wert $[x]$, die Gaußklammer von x , diejenige größte ganze Zahl, die kleiner oder gleich x ist.)

$$h_L = \begin{cases} x_{<s>} & \text{wenn } s \text{ eine ganze Zahl ist} \\ \frac{1}{2}(x_{<s-\frac{1}{2}>} + x_{<s+\frac{1}{2}>}) & \text{sonst} \end{cases}$$

$$h_U = \begin{cases} x_{<n-s+1>} & \text{wenn } s \text{ eine ganze Zahl ist} \\ \frac{1}{2}(x_{<n-s+\frac{1}{2}>} + x_{<n-s+\frac{3}{2}>}) & \text{sonst} \end{cases}$$

Diese beiden hinges werden etwas anders berechnet als die „klassischen“ Quartile $x_{1/4}$ und $x_{3/4}$, es gilt allgemein: $x_{1/4} \leq h_L$ und $h_U \leq x_{3/4}$; die hinges liegen also, wenn sie nicht gleich den Quartilen sind, näher am Median.

Bei ordinalskalierten Daten mit ganzzahligen Werten sind alle drei betrachteten Größen, der Median sowie oberer und unterer hinge, ebenfalls ganzzahlig oder sie liegen genau zwischen den Werten.

Im Boxplot werden nun der obere und der untere hinge (auch Tukey's hinges genannt) als Grenzen der mittleren Box abgetragen. Der abgesetzte mittlere Strich der Box ist der Median. Es gilt immer: $h_L \leq x_m \leq h_U$. Die Höhe der Box gibt den zentralen Bereich an, in dem sich ungefähr 50% aller Daten realisieren.

Die beiden senkrechten Striche ober- und unterhalb der Box gehen bis zu den größten bzw. kleinsten Werten, die keine Ausreißer sind. Als Ausreißer werden hier diejenigen Daten bezeichnet, die mehr als das Anderthalbfache der Boxhöhe vom Rand der Box entfernt sind. Diese Daten werden mit Angabe der Fallnummer als weiße Kreise (°) dargestellt.

Daten, die mehr als das Dreifache der Boxhöhe vom Rand der Box entfernt sind gelten als Extremwerte und sind, ebenfalls mit Angabe der Fallnummer, als Sternchen (*) dargestellt.

An der unteren Achse ist die Anzahl der Daten angegeben auf der die Rechnungen beruhen.

Werte mit mehr als drei Boxhöhen Abstand

vom oberen Rand der Box (Extremwerte)..... *

Werte mit mehr als eineinhalb Boxhöhen Abstand

vom oberen Rand der Box (Ausreißer)..... o

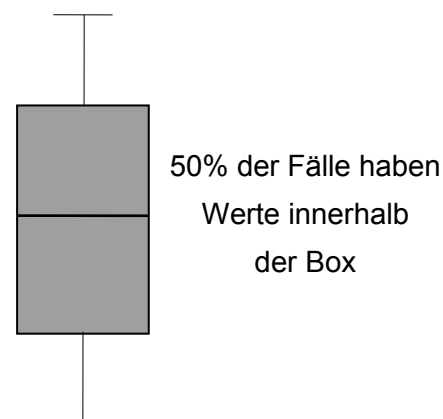
Größter Wert der kein Ausreißer ist.....

Oberer hinge h_U

Median x_m

Unterer hinge h_L

Kleinster Wert der kein Ausreißer ist.....



Werte mit mehr als eineinhalb Boxhöhen Abstand

vom unteren Rand der Box (Ausreißer)..... o

Werte mit mehr als drei Boxhöhen Abstand

vom unteren Rand der Box (Extremwerte)..... *

B Anhang

B.1 Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer an der Philipps-Universität Marburg waren die Damen und Herren:

Arnold, Aumüller, Barth, Bartsch, Basler, Baum, Beato, Beyer, Brilla, Cetin, Christiansen, Czekelius, Czubayko, Daut, Eilers, Engenhardt-Cabillic, Feuser, Gemsa, Gerdes, Geus, Goerke, Gotzen, Griss, Grzeschik, Gudermann, Hadji, Happle, Hasilik, Hassan, Hebebrand, Hellinger, Hesse, Herzum, Hofmann, Jungclas, Kälble, Kalder, Kern, Klenk, Klose, Köhler, König, Koolman, Kretschmer, Krieg, Lammel, Lang, Lennartz, Lippert, Löffler, Lohoff, Lorenz, Maisch, Mann, Mennel, Moll, Moosdorf, Mueller, Müller, Mutters, Neubauer, Oertel, Reichardt, Remschmidt, Renz, Richter, Röhm, Rosenow, Rothmund, Schäfer, Schmidt, Schmitz, Schnabel, Schneyer, Schulz, Seitz, Sekundo, Seyberth, Slenczka, Sommer, Steiniger, Stiletto, Sudik, Vogelmeier, Vohland, Voigt, Wagner, Weihe, Wennemuth, Werner, Westermann, Wichert v., Wiegandt, Zielke.

B.2 Danksagung

Ich bedanke mich bei allen Personen, die mir die Erstellung der vorliegenden Arbeit ermöglicht haben.

Herrn Professor Dr. Vogelmeier für die Möglichkeit, in der Klinik für Innere Medizin mit dem Schwerpunkt Pneumologie zu forschen.

Herrn Prof. Dr. med. U. Wagner danke ich für die Vergabe des Themas dieser Dissertation und für seine fachliche Unterstützung.

Frau P. Staats danke ich dafür, dass sie meine Arbeit neben Herrn Prof. Wagner mit großem Arbeitseinsatz betreute und zu allen Fragen mit Rat und Tat zur Seite stand.

Der Arbeitsgruppe der Phillips-Universität Marburg mit ihren Mitarbeitern H. Priebe und K. Oplesch danke ich für ihre tatkräftige Unterstützung und ihr Engagement.

Ebenfalls danke ich auch meiner Kollegin und Mitstreiterin S. Heimann, mit der ich eine ereignisreiche und arbeitsintensive Zeit verlebt habe.

Schließlich danke ich meinen Eltern, die all die Jahre an meiner Seite standen, meinen Freunden und meinem Ehemann Dr. Martin Krohm, der meine Lebensqualität bei der Vollendung der Dissertation erhalten hat und jederzeit für mich da war.

B.3 Veröffentlichungen

Abstracts:

- 1) Wagner, U., Krohm, I., Nowak, L., Oplesch, K., Ruppert, V., Groneberg D. A., Staats, P. Sekretomodulatorische Effekte von NO₂ auf die tracheobronchiale Muzinsekretion, untersucht an zwei Rattenstämmen, *Pneumologie* 59 (S1), S 16, P474 (2005).
- 2) Staats, P., Hein, S., Heimann, S., Krohm, I., Böhm, S. K., Wagner, U. Pro-inflammatory cytokines stimulate airway mucus secretion in a rat model of COPD, *Eur. Respir. J.* 18, Suppl. 33: 520s, 3504 (2001).
- 3) Staats, P., Krohm, I., Heimann, S., Oplesch, K., Wagner, U. Sekretagoge Effekte von GM-CSF in einem Rattenmodell der COPD sowie der humanen trachealen Drüsenzelllinie MM39, *Pneumologie* 56 (S1), S 84, P148 (2002).
- 4) Staats, P., Heimann, S., Krohm, I., Hein, S., Oplesch, K., Vogelmeier, C., Wagner, U. Pro-inflammatorische Zytokine stimulieren die tracheobronchiale Muzinsekretion in einem Rattenmodell der COPD sowie im humanen Zellkulturmodell. *Med. Klin.* 97: 154, P-278 (2002).